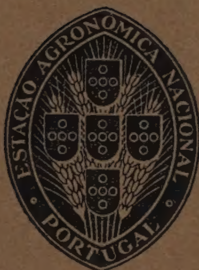
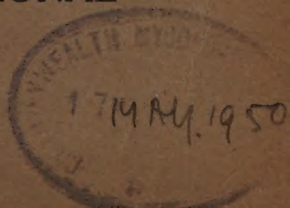
AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 9 — N.º 4
1947



ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL
QUINTA DA ALDEIA - SACAVÉM
PORTUGAL



AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 9 — N.º 4
1947



Estação Agronómica Nacional
PORTUGAL

Composição e impressão das Oficinas
da Tip. Alcobacense, Lt. — Alcobaça

O VIRUS
DO MOSAICO AMARELO DO NABO

POR *MARIA DE LOURDES V. BORGES*
(Estação Agronómica Nacional)

INTRODUÇÃO

Em Fevereiro de 1946, o Prof. BRANQUINHO D'OLIVEIRA, observou que, no campo de *Brassica Napus* L. existente na Tapada da Ajuda, algumas plantas apresentavam mosaico muito intenso. Enviou-as para a Estação Agronómica Nacional onde pela inoculação nos hospedeiros diferenciadores que se vinham utilizando para o estudo dos Virus das Crucíferas (OLIVEIRA e BORGES, 1944 *a*, *b*-1945), se verificou tratar-se de Virus que se manifesta de maneira diferente, em relação aos anteriormente estudados, pelo curto período de incubação, pela intensidade e aspecto dos sintomas.

No fim de Março do mesmo ano, teve-se conhecimento que MARKHAM and SMITH (1946) tinham isolado um Virus que consideram citado pela primeira vez e que designam por « Turnip Yellow Mosaic Virus », cujas propriedades se assemelham às do Virus da Tapada.

No presente trabalho procura-se indicar os resultados do estudo feito para este Virus e comparar com outros Virus anteriormente descritos para as Crucíferas, destacando a possível identificação com o *Turnip Yellow Mosaic Virus* Mark. and Smith.

CARACTERÍSTICAS DO VIRUS

Aspecto no campo

Em Fevereiro, notou-se que no nabal existente na Tapada da Ajuda, em Lisboa, algumas plantas manifestavam sintomas de virose. As folhas mais novas apresentavam clorose das nervuras, formando reticulado, as médias mosaico, e as mais velhas clorose quase completa do limbo, com raras ilhas verdes. É a intensa clorose que faz com que saltem à vista, no campo, as plantas doentes. Em Janeiro de 1947, idêntico aspecto se observou em nabos deixados no campo, em Galamares, Sintra.

Transmissão

Na transmissão a *Brassica Napus*, por inoculação mecânica de extracto de folhas das plantas infectadas encontradas no campo e usando carborundo como abrasivo, obteve-se ao fim de 8-10 dias o aparecimento de sintomas em 100 % das plantas inoculadas.

A tentativa de transmissão ([1]) por insectos — *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae* — mostrou que estes afídeos, nas condições experimentadas não são vectores do Virus em estudo.

Reacção de vários hospedeiros

Assegurada a possibilidade de manter e transmitir o Virus, procurou-se conhecer se o curto período de incubação se mantinha para outros hospedeiros e se os sintomas diferiam dos produzidos por outros virus de Cruciferas que se vinham estudando e de que este parecia afastar-se acentuadamente. Fez-se por isso a inoculação noutras espécies de Cruciferas, quer cultivadas — *Brassica oleracea, B. chinensis, Raphanus sativus,* etc. —, quer espontâneas — *Raphanus Raphanistrum, Rapistrum rugosum, Malcolmia maritima,* etc. — e ainda em duas Solanáceas — *Nicotiana tabacum* e *N. glutinosa.*

No Quadro I, descrevem-se resumidamente os sintomas obtidos nos diversos hospedeiros. Note-se a frequência da clorose das nervuras e a rara existência de rugose e necrose nos casos observados.

Os sintomas no nabo começam por clorose das nervuras. A este aspecto sucede o de mosaico e por último a clorose generaliza-se a todo o limbo deixando uma ou outra ilha verde. A sucessão dos sintomas dá-se tal como se poderia prever do exame das folhas de várias idades, nos nabos encontrados no campo.

O não aparecimento de sintomas nas diversas variedades de *Brassica oleracea* experimentadas, levou a procurar se isso correspondia à não multiplicação do Virus na couve e portanto a imunidade absoluta desta espécie, ou se pelo contrários a multiplicação se dava e o Virus existia sem que o hospedeiro mostrasse qualquer alteração aparente, isto é se se tratava dum caso de

---

([1]) As experiências de transmissibilidade, por afídeos foram realizadas por HUMBERTO DIAS, e fazem parte do relatório de Tirocínio do curso de Engenheiro Agrónomo.

QUADRO I

Sintomas obtidos por inoculação

Plantas inoculadas	Sintomas
Alyssum corymbosum Boiss.	Clorose das nervuras. Mosaico. Rugose. Redução da superfície foliar.
A. edentulum W. et K.	Clorose das nervuras. Rugose. Redução da superfície foliar.
Barbarea orthoceras Lebed.	Clorose das nervuras, com tendência a propagar-se a todo o limbo.
B. verna (Mill.) Aschers.	Mosaico.
B. vulgaris R. Br.	Clorose das nervuras mais finas formando rêde pouco evidente. Por inoculação retrograda deu sintomas nítidos em *Brassica chinensis* L.
Biscutella auriculata L.	Clorose intensa formando mosaico, seguida de clorose geral do limbo.
B. ciliata DC.	Mosaico.
B. didyma L.	Mosaico.
B. laevigata L.	Clorose das nervuras. Mosaico.
Brassica chinensis L.	Lesões cloroticas locais. Clorose das nervuras formando rêde, seguida de mosaico e por fim clorose de todo o limbo, deixando ilhas verdes ou mantendo-se apenas a margem verde. Acentuada redução da superfície foliar.
B. Juncea (L.) Coss.	Clorose das nervuras extensível a todo o limbo. Ligeira torsão das folhas.
B. Napus L.	Clorose das nervuras, formando rede, seguida de mosaico de contrastes bem marcados e por fim clorose quase geral com raras ilhas verdes. Os sintomas são semelhantes nas 10 variedades experimentadas.
B. Napus L. f. *oleifera* Koch	Clorose das nervuras.
B. nigra Koch	Mosaico ligeiro.
B. oxyrrhina Coss.	Mosaico. Redução da superfície foliar.
B. Rapa L. f. *annua* (Metzger) Koch	Clorose das nervuras.
B. sabularia Brot.	Clorose. Redução da superfície foliar.
Capsella Bursa-pastoris (L.) Med.	Clorose. Rugose. Redução da superfície foliar.

(Continuação do Quadro I)

Plantas inoculadas	Sintomas
Coronopus procumbens Gilib.	Mosaico.
Crambe hispanica L.	Clorose das nervuras. Mosaico. Redução da superfície foliar.
Diplotaxis catholica (L.) DC.	Mosaico. Redução da superfície foliar.
Eruca sativa Coss.	Mosaico. Redução da superfície foliar.
Erysimum cheiranthoides L.	Mosaico.
E. Marshallii Boiss.	Clorose das nervuras. Torsão das folhas.
Farsetia clypeata (L.) R. Br.	Clorose do limbo excepto junto a nervura.
Hesperis matronalis L.	Clorose das nervuras e do limbo.
Hirschfeldia incana (L.) Lag.-Fass.	Mosaico.
Iberis umbellata L.	Manchas necroticas. Necrose do limbo com morte da folha. Necrose do caule.
Isatis tinctoria L.	Mosaico. Enrolamento longitudinal das folhas
Lepidium heterophyllum (DC.) Benth.	Mosaico. Redução da superfície foliar. Nanismo.
L. satívum L.	Clorose das nervuras. Mosaico, Redução da superfície foliar.
Lobularia marítima (L.) Desv.	Pontuações cloroticas. Mosaico ligeiro.
Malcolmia maritima R. Br.	Clorose das nervuras. Mosaico. Rugose. Redução da superfície foliar.
Moricandia arvensis (L.) DC.	Clorose das nervuras com alastramento ao limbo. Sintomas muito demorados no aparecimento.
Myagrum perfoliatum L.	Clorose das nervuras.
Nasturtium officinale R. Br.	Mosaico.
Raphanus sativus L.	Clorose das nervuras muito marcada formando rede.
R. Raphanistrum L.	Clorose das nervuras, seguida de clorose do limbo, deixando apenas ilhas verdes.
Rapistrum rugosum L.	Clorose das nervuras. Torsão do caule.
Sinapis alba L.	Clorose das nervuras. Mosaico.
S. arvensis L.	Clorose das nervuras. Mosaico.
Sisymbrium officinalle (L.) Scop.	Redução da superfície foliar. Roseta. Necrose das nervuras.
Thlaspi virgatum Gr. et Sieb.	Clorose das nervuras e do limbo. Redução da superfície foliar

congenialidade do hospedeiro. Com esse fim, inoculou-se couve da China com suco extraído de couve, couve Bacalan e couve mil folhas que embora tivessem sido inoculadas, não tinham manifestado sinais de infecção. Como testemunha usou-se a inoculação, também em couve da China, de suco proveniente de cada uma das três variedades de couve não prèviamente inoculadas. As inoculações testemunhas não originaram qualquer alteração no aspecto da couve da China, ao passo que as outras inoculações deram frequentemente origem a sintomas nítidos. Parece pois tratar-se dum porta virus sem sintomas, no entanto a não constância destes resultados em todas as inoculações retrogradas que se fizeram levam a não poder afirmá-lo em absoluto.

Obtivemos resultados negativos para as seguintes espécies:

Allyssoides utriculata Med.
Allyssum Borzeanum Nyar.
Allyssum maritimum Lam. var. *Benthani* Host
Allyssum rostratum Stevs.
Arabis alpina L. var. *pieninica* Val.
Arabis corymbiflora Vest.
Berteroa incana (L.) DC.
Bunias orientalis L.
Cakile maritima Scop.
Diplotaxis Sieberi Presl.
Erysimum comutatum Panc.
Erysimum repandum L.
Iberis ciliata All.
Iberis garrexiana All.
Malcolmia littorea (L.) R. Br.
Matthiola incana (L.) R. Br.

Não conseguimos também inoculações positivas, nas seguintes Solanáceas:

Nicotiana glutinosa L.
Nicotiana Tabacum L.

Todos estes resultados se confirmaram por inoculações retrogradas que provam não se tratar de porta-virus sem sintomas.

O curto período de incubação observado na transmissão a *Brassica Napus* manteve-se para as outras espécies experimentadas

com o mínino de 7 dias para a couve da China. Há contudo vários factores que influem na maior ou menor brevidade com que os sintomas se manifestam, tais como a intensidade luminosa e a concentração do virus no extracto.

Para ver a influência do período de iluminação no aparecimento dos sintomas inocularam-se dois lotes de 10 plantas. Um

QUADRO II

Infuência da diluição no período de incubação

Tratamento	Infecções após (dias): 13	15	17	22	24
Suco não diluido	5	5	5	5	5
1:100	5	5	5	5	5
1:500	5	5	5	5	5
1:1000	4	4	5	5	5
1:10000	3	3	3	3	3
1:100000	0	1	1	1	2
1:200000	0	0	0	1	1

ficou nas condições normais, outro foi posto em câmara escura das 12 às 15, as horas de maior intensidade luminosa. Verifícou-se que embora em todas viessem a aparecer sintomas, eram mais precoces nas que haviam tido redução no período de luz.

Nos ensaios de resistência à diluição verificou-se que o período é mais longo à medida que a diluição aumenta (Quadro II).

Propriedades «in vitro»

À medida que se observava a sintomatologia em diversos hospedeiros, ia-se acentuando a primeira impressão de que se tratava de Virus diferente dos outros virus de Crucíferas com que se estava trabalhando. Procurou-se para confirmação, averiguar a resistência à diluição e ao calor e a conservação «in vitro».

Como se verificou que das espécies experimentadas é em *Brassica chinensis* que o Virus apresenta o mais curto período de incubação, e em que os sintomas são mais acentuados, usou-se princi-

palmente esta espécie para ser inoculada com o Virus depois de sujeito aos vários tratamentos «in vitro».

Resistência à Diluição: Fizeram-se várias séries de inoculações para determinar a resistência à diluição. Na primeira série usou-se suco de nabo com sintomas evidentes e as diluições de 1 : 10, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 10.000 e 1 : 100.000. Verificou-se que mesmo para a diluição mais alta se obtinha 100 % de resultados positivos pela inoculação em nabo.

QUADRO III

Propriedades físicas

Resistência à Diluição			Resistência ao calor		Longevidade	
Tratamento	Infecções (1)		Tratamento	Infecções (1)	Tratamento	Infecções (1)
	Suco de F. lha	Suco de Raiz				
Suco não diluido	5	5	40°	5	2 dias	5
1:100	5	5	50°	5	3 »	5
1:500	5	5	60°	4	4 »	5
1:1000	5	4	70°	0	6 »	5
1:10000	3	1	80°	0	9 »	1
1:100000	2	1	90°	0	10 »	0

As outras séries feitas com extracto de couve da China e inoculadas em plantas desta mesma espécie, deram os resultados que se podem observar no Quadro III, para suco extraído de folhas ou de raízes das mesmas plantas. A diferença no número de resultados positivos no caso das folhas e das raízes, deve atribuir-se a alguma água que sempre fica aderente quando se lavam as raízes e que vai aumentar a diluição.

Resistência ao Calor: Colocou-se suco de plantas doentes em banho-maria a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100° durante 10 minutos. Aquecimento a temperaturas superiores a 60° destruiu a acção infecciosa do Virus.

(1) Os números dados correspondem a plantas infectadas por cada 5 inoculadas.

Longevidade: Em tubo de ensaio com rolha de algodão, conservou-se no laboratório, o extracto de que se retirou diàriamente 1 cc. para inocular 5 plantas. Suco com 9 dias ainda deu inoculações positivas, embora em muito baixa percentagem. Com suco de 10 dias não obtivemos nenhuma infecção.

Isolamento e cristalização

O facto de se tratar dum Virus com elevada concentração em determinadas plantas e grande resistência aos tratamentos «in vitro» levava a crer que seria fácil o seu isolamento. Com efeito MARKHAM and SMITH (1946) descrevem um método de isolamento que se seguiu com bons resultados. Fundamenta-se na floculação das proteínas normais das plantas pelo álcool, em determinadas proporções para que o Virus não seja destruído, seguida de centrifugação. O Virus é precipitado do líquido sobrenadante sob a forma de cristais pela acção do sulfato de amónio. Nas microfotografias da Estampa III podem observar-se esses cristais que são na maioria octaedros perfeitíssimos e que se obtiveram a partir de extracto de *Brassica chinensis* L.

COMPARAÇÃO COM OUTROS VIRUS DE CRUCÍFERAS

Os sintomas observados neste Virus, o curto período de incubação, a alta resistência às diluições, a não transmissão por afídeos e a ausência de sintomas em *Nicotiana glutinosa* e em *N. tabacum*, distinguem-no como se pode ver no Quadro IV, dos Virus de Cruciferas anteriormente descritos. O único que se aproxima é o Turnip Yellow Mosaic Virus Markh. and Smith com o qual o identificamos.

DESCRIÇÃO

Em Portugal, o Virus do mosaico Amarelo do Nabo, colheu-se pela primeira vez em Fevereiro de 1946, na Tapada da Ajuda em Lisboa, e voltou a colher-se em Janeiro de 1947 em Galamares, Sintra.

É fàcilmente transmissível por inoculação mecânica com suco e usando carborundo como abrasivo. Intransmissível por *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae*.

QUADRO IV

Comparação com outros Virus de Cruciferas

VIRUS	Período de incubação (dias)	Diluição limite	Idade letal	Temperatura letal	Transmissão por :		Reacção em :	
					Brevicoryne	Myzus	Glutinosa	Tabaco
Cabbage black ring 1938 TOMPKINS	9 - 21	1:700	2 - 3	57 - 59	+	+	+	+
Cabbage ring necrosis 1941 LARS. and WALK.	17 - 21	1:500	1 - 2	48 - 50	+	+	+	+
Turnip mosaic 1935 HOGG. and JOHNS.	8 -	1:1000	2 - 3	53 - 54	+	+	+	+
Turnip mosaic 1939 TOMPKINS	13 - 21	1:3000	2 - 3	60 - 63	+	+	+	+
Chinese cabbage mosaic 1938 TOMPK. and THOMAS	13 - 22	1:5000	3 - 4	73 - 75	+	+	+	+
Mild stock mosaic 1939 TOMPKINS	± 20	1:4000	5 - 6	58 - 60	+	+	+	+
Cabbage mosaic 1939 LARSON and WALKER		1:2000	1 - 2	55 -	+	+	+	+
Caulliflower mosaic 1937 TOMPKINS	10 - 20	1:2000	14 - 15	70 - 75	+	+	—	—
Severe stock mosaic 1939 TOMPKINS	± 14	1:3000	7 - 8	58 - 60	+	+	—	+
Radish mosaic 1939 TOMPKINS	8 - 18	1:14000	14 - 16	65 - 68	—	—	—	+
Turnip yellow mosaic 1946 MARKH. and SMITH		1:100000			—	—	—	—
Virus em estudo	7 - 13	1:200000	9 - 10	60 - 70	—	—	—	—

No nabo os primeiros sintomas são a clorose das nervuras a que se segue mosaico e por fim clorose quase completa do limbo deixando apenas raras ilhas verdes. Na couve da China há por vezes formação de manchas cloróticas circulares nos pontos de inoculação, clorose das nervuras nas folhas imediatas, seguida de clorose na parte central do limbo e por fim apenas se vêem raras ilhas verdes.

Ausência de sintomas em *Nicotiana glutinosa* e *N. tabacum*.

Resistente à diluição de 1 : 200.000, à temperatura de 60° e a 9 dias «in vitro».

Período de incubação 7-13 dias.

Isolável sob a forma de cristais octaédricos, fàcilmento solúveis em água.

SUMMARY

In the present work a study is made of a virus affecting *Brassica Napus* L. in which host a high concentration and active multiplication of the virus is reached.

Symptoms are described in the following species: *Brassica Napus, B. chinensis, Raphanus sativus, R. Raphanistrum, Cheiranthus Cheiri, Malcolmia maritima*, etc.

No apparent symptoms were obtained by mechanical inoculation on *Nicotiana tabacum*, and *N. glutinosa* neither when the transmission by *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* to *Brassica Napus* was attempted.

Some phisical properties were determined and the Virus was shown to be infective at a diluition of 1 : 200.000, resistant to 9 days «in vitro» and to 10 minutes at 60° C.

Good octaedric crystals are easily obtained, when isolated.

A comparision is made with other Crucifer Viruses previously reported by several authors and the possible identification with the Turnip Yellow Mosaic Virus Markh. and Smith is pointed out.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HOGGAN, I. A. and JOHNSON, J.

1935 A Virus of Crucifers and other Hosts. *Phytopathology* **25**: 640-644.

LARSON, R. H. and WALKER, J. C.

1939 A Mosaic Disease of Cabbage. *J. agric. Res.* **59**: 367-392.

1941 Ring Necrosis of Cabbage. *J. agric. Res.* **62**: 475-491.

MARKHAM, R. and SMITH, K. M.
1946 A New Crystalline Plant Virus. *Nature* **157**: 300-301.
OLIVEIRA, M. L. e BORGES, M. L.
1944*a* Estudo dos Virus das Cruciferas. I Estirpes isoladas de Cruciferas espontâneas. *Acta do Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências*. Córdoba.
1944*b* Estudo dos Virus das Cruciferas. II Estirpes isoladas de *Matthiola incana* (L.) R. Br. *Bol. Soc. Brot.* **19** (2.ª série): 265-272.
1945 Estudo dos Virus das Cruciferas. III Estirpes isoladas de *Brassica oleracea* L. *Agr. Lusit.* **7**: 317-335.
SMITH, K. M.
1937 *A Textbook of Plant Virus Diseases*. J. & A. Churchill, London.
TOMPKINS, C. M.
1937 A Transmissible Mosaic Disease of Caulliflower. *J. agric. Res.* **55**: 33-46.
1938 A Mosaic Disease of Turnip. *J. agric. Res.* **57**: 589-602.
1939 Two Mosaic Diseases of Annual Stock. *J. agric. Res.* **58**: 63-67.
1939 A Mosaic Disease of Radish in California. *J. agric. Res.* **58**: 119-130.
TOMPKINS, C. M., GARDNER, M. W. and THOMAS, H. R.
1938 Black Ring a Virus Disease of Cabbage and other Crucifers *J. agric. Res.* **58**: 929-943.
TOMPKINS, C. M. and THOMAS, H. R.
1938 A Mosaic Disease of Chinese Cabbage. *J. agric. Res.* **56**: 541-552.

LEGENDAS DAS GRAVURAS

ESTAMPA I

A — Folha de *Raphanus sativus* L., infectada com Virus do Mosaico Amarelo do Nabo. Clorose das nervuras.
B — Folha de *Brassica Napus* L., infectada com Virus do Mosaico Amarelo do Nabo. Mosaico.
C — *Brassica chinensis* L. infectada com Virus do Mosaico Amarelo do Nabo. Clorose e redução da superfície foliar.

ESTAMPA II

Folhas de *Brassica chinensis* L. infectadas com Virus do Mosaico Amarelo do Nabo.

A — Lesões cloróticas locais.
B — Clorose das nervuras.
C — Clorose do limbo.
D — Clorose geral do limbo deixando apenas ilhas verdes.

ESTAMPA III

A, B — Cristais de Virus do Mosaico Amarelo do Nabo

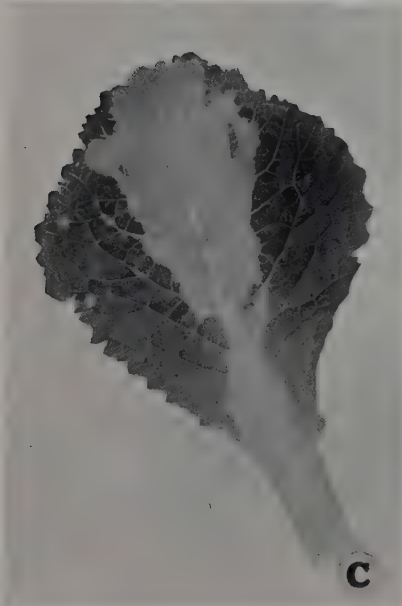

A


B

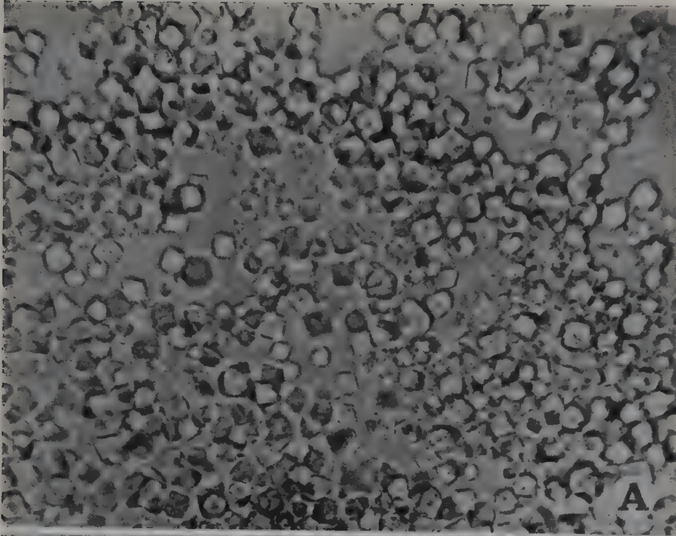

C

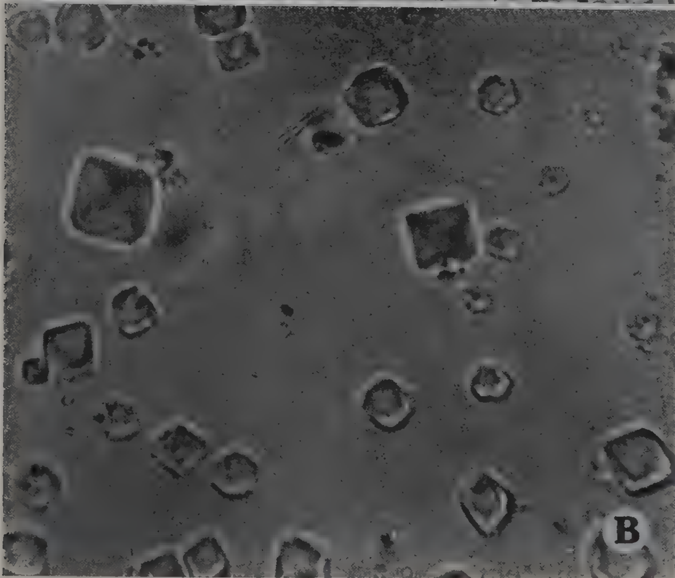

A


B


C


D


A


B

UM HÍBRIDO ESPONTÂNEO DE *CASTANEA CRENATA* SIEB. ZUCC. (VAR. *SIBA-KURI*) E *C. SATIVA* MILLER (VAR. *LONGAL*)

NOTA PRELIMINAR

POR *J. LEÃO FERREIRA DE ALMEIDA*

Em Godinhela — Miranda do Corvo — o Prof. EUSÉBIO TAMAGNINI encontrou, numa propriedade sua, um castanheiro de características muito curiosas que tivemos oportunidade de estudar no Instituto Botânico de Coimbra a quando de um estágio que ali faziamos em 1945.

O Prof. EUSÉBIO TAMAGNINI tem em cultura, na mesma propriedade em que nasceu este castanheiro, diversos castanheiros da var. *longal* e *pourtalonne (portelone)* de *C. sativa* e a var. *Siba-Kuri (Shiba-gouri)* de *C. crenata*.

De facto verificámos que aquele castanheiro, apresentando características morfológicas idênticas às do castanheiro japonês *(C. crenata)*, produzia frutos semelhantes aos de *C. sativa*, — castanhas de tipo longal — possuindo ainda a particularidade interessante de maturar os seus frutos em meados de Setembro, época situada entre o tempo de maturação de *C. crenata* e de *C. sativa*, naquela região.

Observadas estas características, suspeitou-se de que se tratava de uma forma híbrida espontânea entre *C. crenata* e *C. sativa*.

Conhecendo-se as características de resistência à *Phytophthora cambivora* da espécie japonesa *C. crenata* e sabido que os nossos Soutos, constituidos por *C. sativa*, têm sido dizimados por aquele fungo, a obtenção de formas híbridas entre as duas espécies que aliassem às boas qualidades de fruto e madeira de *C. sativa* a alta resistência àquele fungo, manifestada por *C. crenata*, seriam do maior interesse para a economia nacional. Há um quarto de século que em Espanha se vêm realizando trabalhos com este objectivo. NATIVIDADE (1944), quando estabeleceu as « Bases para um plano de reconstituição, valorização e defesa dos Soutos », publicadas em 1945, inclue também trabalhos de melhoramento orientados neste sentido.

Foi, portanto, com o maior empenho que empreendemos o presente estudo cário-sistemático, afim de obter dados que nos permitissem deduzir se a planta em questão era ou não uma forma híbrida.

Procedemos a um estudo comparativo da morfologia externa dos castanheiros, *in loco*, e ainda em material conservado em herbário.

O estudo cariológico foi feito em preparações do suposto híbrido e progenitores, obtidas segundo as técnicas usuais em citologia. Os vértices vegetativos das raízes foram fixados em Nav.-Bruun e corados pela violeta de genciana. O estudo do comportamento meiótico foi feito em esfregaços de anteras fixadas em álcool-acético (3 : 1) e coradas pelo carmim acético e orceina acética.

OBSERVAÇÕES

Sobre a morfologia externa

As espécies do género *Castanea* são muito semelhantes, por vezes de difícil distinção, pelo que a análise das suas formas híbridas se torna particularmente difícil e incerta.

Num estudo comparativo *in loco* dos supostos progenitores e híbrido a que procedemos, notámos maior semelhança do híbrido com *C. crenata*.

CAMUS (1929, pag. 237) descreve um híbrido entre *C. crenata* (var. *Tambaguri*) e *C. sativa*, salientando o grande vigor vegetativo da forma híbrida e a sua maior semelhança com *C. sativa*.

A árvore que estudámos é já adulta (ca. 8 anos) bem mais nova do que os restantes castanheiros ali existentes, motivo por que nem todas as características morfológicas são susceptíveis de comparação. Por este motivo limitamo-nos a referir, numa descrição sucinta da sua morfologia externa, apenas as características que ponham melhor em evidência a interferência dos progenitores: —árvore com grande vigor vegetativo e aparentemente mais viçosa do que as variedades de *C. sativa* e *C. crenata* da mesma idade; folhas lanceoladas, acuminadas, serradas, com o recorte sub-espinescente como sucede nas da var. portuguesa; página inferior do limbo toda coberta de pêlos estrelados, até 10 pontas, conservando-se até tarde, por oposição ao que acontece nos progenitores que têm pêlos com um máximo de 8 pontas, caducos cêdo, e em

geral predominando nas nervuras; as folhas são maiores, mais largas, mais verdes nas duas páginas e de pecíolos mais longos que em *C. crenata*, permanecendo mais tempo na árvore do que as da var. japonesa; os ramos, em especial nas extremidades, são verde-cinzentos por oposição a amarelo-avermelhados no castanheiro japonês; os lançamentos anuais são mais compridos do que os dos progenitores; o período de floração e frutificação é intermédio ao dos progenitores; assim, florescendo cerca de 8 dias depois da var. japonesa (que se antecipa um mês à var. portuguesa) matura os frutos em Setembro, por oposição aos períodos de maturação da var. japonesa que se verifica em Agosto, e da portuguesa que se dá em Outubro. O comprimento dos amentilhos é muito variável e de localização intermédia no ramo, ficando os ouriços dispostos sobre pedúnculos laterais nos ramos do ano, inserindo-se desde a região mediana até quase à extremidade, por oposição aos de *C. crenata* que se dispõem em panícula desde a base, e aos de *C. sativa* que se aglomeram na extremidade dos ramos.

Insistimos que estas observações dizem respeito a um grupo de árvores que vegetam no mesmo local, portanto em relativa igualdade de condições ecológicas.

Os ouriços do híbrido são mais volumosos do que os que produz a var. japonesa, mas inferiores aos da var. portuguesa e com espinhos mais delgados, mais compridos, mas em menor frequência do que na *C. crenata*. Estes espinhos ramificam-se profusamente, um pouco mais acima da base do que o que se verifica na var. japonesa. O pedúnculo dos ouriços é também mais comprido do que os desta variedade.

Produz 1 a 3 frutos por ouriço, maiores (1 a 3 vezes) do que os da var. Asiática, por vezes mesmo maiores do que os da var. portuguesa, mas do mesmo tipo (*longal*), mais compridos do que largos, de excelentes qualidades organolépticas. A cicatriz basilar dos frutos do híbrido é mais desenvolvida do que a dos progenitores, com a figura estelar (conf. RODRIGUES, 1945) atingindo os bordos da cicatriz. Na *C. crenata*, var. *Siba-kuri*, a cicatriz basilar é pequena e com os ramos da figura estelar muito curtos. Na *C. sativa*, var. *longal*, a cicatriz basilar é também pequena, com os ramos da figura estelar quase atingindo os bordos da cicatriz.

Como dissemos, os caracteres da morfologia externa encon-

trados no híbrido revelam um predomínio de factores transmitidos por *C. crenata*. Seria mesmo tomado como descendente exclusivo desta se não houvesse a circunstância de os frutos produzidos e o período de maturação patentearem a interferência de caracteres de outra espécie. Por este motivo nos empenhámos mais em mostrar divergências de *C. crenata* mostrando, sempre que possível, a influência de *C. sativa* naquelas divergências.

Devemos acrescentar ainda que o vigor vegetativo da planta é próprio de vigor híbrido ou heterosis.

Sobre o comportamento meiótico

Tendo-se verificado, atravez de inúmeros estudos citológicos de híbridos e espécies «puras», diferenças de comportamento características de umas e outras, o recurso à cariologia comparada passou a ser utilizado como auxiliar importante na pesquiza da origem de muitas plantas, particularmente na determinação das relações prováveis de indivíduos em que as diferenças morfológicas são pouco evidentes. A questão que nos propomos analisar é uma das que beneficiam do concurso da cariologia comparada, dada a grande semelhança morfológica existente entre *Castanea crenata*, *C. sativa* e híbrido.

O número básico do gén. *Castanea* é x = 12. A espécie *C. sativa* já tinha sido estudada por JARETZKY (1930).

Sobre *C. crenata* não encontrámos quaisquer referências citológicas na bibliografia que consultámos. Por este motivo procedemos a um estudo sumário da sua cariologia, procurando apenas os elementos que nos auxiliassem a melhor compreender e interpretar o comportamento meiótico do híbrido. E assim verificámos que o número haplóide de *C. crenata* é n = 12 (fig. 5) e que as diferentes fases da meiose decorrem com regularidade formando-se sempre 12 bivalentes na metafase I. Apesar, pois, de se tratar de uma planta ecològicamente deslocada, os seus hábitos fisiológicos não se ressentiram de forma a alterar o seu comportamento meiótico de diplóide.

O estudo comparativo de idiogramas, da maior importância em determinações filogenéticas, não pôde aqui ser feito dada a dificuldade técnica actual de nos revelar, com rigor suficiente, diferenças morfológicas entre as guarnições dos progenitores e

híbrido. Por este motivo temos de restringir a parte citológica do nosso estudo à observação do comportamento meiótico do híbrido investigando se, nas diferentes fases da meiose, se encontram aquelas irregularidades típicas das formas híbridas, (SAX, 1935; JENSEN, 1938), comparando em seguida os resultados obtidos com aqueles que caracterizam os progenitores.

O número de cromosomas somáticos que encontrámos no híbrido foi de 2n = 24 (fig. 1), como vemos, simples bastonetes de exíguas dimensões.



Fig. 1 — *Castanea crenata* × *sativa*, metafase somática com 2n = 24.
Fig. 2, 3 e 4 e 6 a 10 — Irregularidades meióticas observadas.
Fig. 5 — *C. crenata*, n = 12.

Parece-nos desnecessário descrever as diferentes fases da meiose do híbrido, bastando-nos referir as irregularidades encontradas e demais elementos que, com fundamento, contribuam para averiguar se a planta em estudo é de origem híbrida. Assim, encontramos figuras de profase (diacinese, fig. 2) que denotam a existência de univalentes, bem evidenciados pelo número de conformações existentes. Estas diacineses podem também denunciar uma separação prematura de bivalentes, fenómeno aliás que tem o mesmo valor em análise de formas híbridas. Onde porém se observam univalentes com toda a evidência é na metafase, dada a grande redução de dimensões e uniformização de contornos dos cromonemata. A natureza univalente destas formações (figs. 3, 4 e 6) não deixa qualquer dúvida quer pela posição em que se encontram, quer pelo número total de elementos contáveis, supe-

rior a 12. Na fig. 3 vêm-se 2 univalentes e na fig. 6 vêm-se 3 univalentes, situados em polos opostos da mesma placa metafásica. Observámos anafases em que alguns univalentes se atrazam no citoplasma (fig. 8), devendo dar então origem a microcitos ou a micronúcleos. Estes retardatários podem provir de univalentes que não foram incluidos indivisos nos grupos polares ou que não se tenham dividido a tempo de serem incluidos nos grupos polares. É muito frequente encontrarem-se placas metafásicas com bivalentes e univalentes que não congregaram, fig. 4.

Também se encontram num mesmo lóculo de antera, células mães de pólen que apresentam metafases regulares e outras com um ou mais univalentes. Por vezes a posição dos univalentes parece indicar ter-se dado uma disjunção antecipada.

Como acabamos de ver encontram-se univalentes na planta que é objecto do nosso estudo. A sua existência tem sempre maior ou menor influência na formação final dos micrósporos normais. Como é sabido, os univalentes distribuem-se irregularmente pela célula, dependendo da posição que ocupam nesta a maior ou menor fertilidade dos micrósporos resultantes. A perda de cromatina, sob a forma de micronúcleos, provém da não inclusão de univalentes ou elementos de polivalentes nos grupos polares.

Nas observações sumárias a que procedemos em preparações de anteras em divisão, de *C. crenata* e *C. sativa*, tivemos ocasião de ver que os bivalentes se distribuem normalmente pelas placas metafásicas, em número de 12; não vimos irregularidades e a contagem é, em regra, fácil, fig. 5, e quase sempre de determinação possível. No híbrido, pelo contrário, é raro encontrar-se uma célula que dê contagem perfeita em consequência da aglomeração em que sempre se encontram os cromosomas, ocorrência que atribuimos a dificuldades no emparelhamento dos genómios dos pais.

Na anafase do híbrido encontram-se também algumas irregularidades que não seria natural verificarem-se se os genómios da guarnição fôssem completamente homólogos. Com efeito, a presença de retardatários, fig. 8, e de pontes, fig. 7, denunciam bem a existência de genómios parentais dissemelhantes. Na fig. 7 vê-se uma ponte anafásica (mais longa do que seria normal, em consequência de uma ligeira compressão sofrida pela célula a quando da execução do esfregaço), irregularidade que, conquanto não seja frequente, mostra a dificuldade de disjunção de alguns



Híbrido espontâneo

Castanea crenata × *C. sativa*

elementos da guarnição. A ponte também pode revelar inversões e, portanto, diferenças estruturais entre os genómios dos pais.

Na divisão II observam-se algumas irregularidades, porém com menor frequência do que na divisão heterotípica. Assim, na fig. 9 vemos uma metafase II com um cromosoma que se conserva entre os dois núcleos metafásicos e que provàvelmente viria a originar um micronúcleo. Na fig. 10 vêm-se 4 retardatários que provàvelmente não seriam incluidos nos grupos telofásicos e que originariam micronúcleos.

Estas são as principais irregularidades encontradas e que sem dúvida trazem uma preciosa contribuição para o esclarecimento da origem da planta em estudo, se considerarmos que se trata de uma planta que resultou do cruzamento de dois diploides, contendo o mesmo número de cromosomas somáticos e de morfologia externa muito semelhante. Como é evidente, o comportamento meiótico do híbrido seria tanto mais regular quanto maior fôsse a homologia entre as guarnições dos progenitores; uma total regularidade não invalidaria a sua condição híbrida. As irregularidades encontradas mais pesam, portanto, a favor de uma atribuição de origem híbrida à planta em questão.

DISCUSSÃO

Apesar da grande semelhança que existe entre as diferentes espécies do Gén. *Castanea*, a comparação dos caracteres morfológicos das duas espécies *C. crenata* Sieb. Zucc. e *C. sativa* Miller, cultivadas onde apareceu o castanheiro que é objecto desta nota, com a morfologia deste, revelam que a planta em estudo deve ter uma origem híbrida, embora com características que a colocam mais próxima de *C. crenata*. No entanto, os caracteres dos frutos e os períodos de floração e frutificação mostram bem a interferência de *C. sativa* como progenitor.

O estudo comparativo do comportamento meiótico dos progenitores e híbrido, forneceu-nos também dados que levam a atribuir uma origem híbrida à planta em questão.

Tivemos ocasião de ver que as espécies *C. crenata* e *C. sativa* eram diplóides, possuindo na haplofase n = 12 cromosomas. Como regra, nas espécies diplóides verifica-se um emparelhamento regular de cromosomas e formação, em percentagem elevada, de micrós-

poros normais. Vimos já que uma tal regularidade meiótica se encontrava em *C. crenata* e *C. sativa*. Do cruzamento entre estas duas espécies resultará um híbrido que terá um comportamento meiótico tanto mais regular e será tanto mais fértil quanto maior fôr a homologia das guarnições dos progenitores. Todavia, esta regularidade, a verificar-se, em nada invalidaria a origem híbrida, apenas tornava assáz difícil a sua análise e provava elevada homologia nos genómios dos pais. Não é o caso presente, pois que, como vimos, a planta que é objecto do nosso estudo, tendo resultado do cruzamento de duas espécies ecològicamente diferentes, uma Europeia e outra Asiática, com igual número de cromosomas, revela algumas irregularidades nas divisões heterotípicas que denunciam a sua proveniência híbrida.

Referimos a existência de univalentes, a formação de pontes, de retardatários, a não congressão de alguns cromosomas, assincronismo na divisão das células de cada lóculo de antera, como fenómenos que ocorrem num conjunto de movimentos mais ou menos regulares do núcleo de uma planta proveniente do cruzamento entre duas espécies diplóides. Como, porém, o híbrido é vigoroso e fértil temos que admitir a existência de suficiente homologia génica para permitir uma distribuição uniforme dos cromosomas nas tétradas e a formação normal de gametas viáveis.

Idêntico fenómeno se observa nos cruzamentos do Gén. *Vitis* entre espécies Americanas e Europeias que originaram algumas castas de uvas bastante produtivas a despeito das suas irregularidades meióticas.

A várias causas se podem atribuir as irregularidades encontradas na forma híbrida do castanheiro: genómios parentais portadores de factores genéticos essenciais dissemelhantes existentes em plantas cuja evolução, devido ao seu isolamento geográfico, se tem feito sem que uma interfira com a outra, diferenças estruturais cromosómicas, condições de ambiente, temperatura, etc.. Quere-nos parecer, contudo, dada a pequena frequência das irregularidades, no entanto com valor bastante para atribuir à planta em estudo uma origem híbrida, que elas deverão provir da primeira causa apontada.

Presume-se que as divisões do saco embrionário decorram também com suficiente regularidade visto que a planta é bastante produtiva.

NATIVIDADE (1936) comparando os caracteres da morfologia externa e a segregação do híbrido *Quercus Ilex* × *Q. Suber* P. Cout. com os dos progenitores concluiu que aquele era de facto uma forma híbrida entre as referidas espécies. Verificou também, mediante estudos histológicos, que na constituição do ritidoma se encontravam os elementos estruturais que caracterizam as espécies progenitoras.

Como acabamos de ver, quer a análise morfológica quer a cariológica dos progenitores e híbrido levam à conclusão que a planta que foi objecto do nosso estudo resultou do cruzamento natural entre *C. crenata* (var. *Siba-kuri*) e *C. sativa* (provàvelmente a var. *longal*).

Desconhece-se o sentido do cruzamento; dado porém o facto de as espécies do gén. *Castanea* serem protândricas e ainda o de a floração de *C. crenata* se antecipar de mais de um mês em relação a *C. sativa*, parece mais provável que tenha sido o pólen de *C. sativa* que tenha fecundado *C. crenata* e não a inversa. Por este motivo escrevemos os progenitores pela ordem que nos parece mais verosímil

Castanea crenata × *C. sativa*

Conhecida a origem do híbrido e sabido que os frutos produzidos reunem apreciáveis qualidades organolépticas e que a sua maturação se antecipa de 15 a 30 dias às variedades nacionais, com dimensões que lhe não são inferiores, bem como apreciável vigor vegetativo, parece-nos da maior oportunidade aceitar a oferta do Professor EUSÉBIO TAMAGNINI que com inexcedível gentileza, coloca à disposição dos Serviços competentes este híbrido para que se possa averiguar do grau de resistência à *Ph. cambivora*, quer do indivíduo quer da sua descendência, em trabalhos de inoculação feitos com as diferentes raças conhecidas daquele fungo e, no caso de se verificar a sua resistência, aproveita-lo em trabalhos de melhoramento.

Algumas plântulas da F_2 deste castanheiro, que mantemos em cultura, mostram bem ter-se dado uma segregação de caracteres dos progenitores pois que se encontra uma diversidade acentuada de caracteres morfológicos compreendidos entre os caracteres distintivos de *C. crenata* e de *C. sativa*.

Estas plantas foram já submetidas a ensaios de resistência à *Ph. cambivora* pelo Eng. Silvicultor COLUMBANO TAVEIRA FERNANDES que obteve resultados muito interessantes.

SUMÁRIO

Um estudo comparativo da morfologia externa de *Castanea crenata*, *C. sativa* e de uma forma espontânea de *Castanea* aparecida no mesmo local onde aquelas duas espécies vivem em cultura, levou-nos à conclusão de que a forma espontânea é um híbrido entre *C. crenata* e *C. sativa.*

A iguais conclusões nos conduziu o estudo cariológico do híbrido e progenitores.

A observação da descendência do híbrido mostra dar-se uma segregação de caracteres dos progenitores, encontrando-se entre os fenotipos, uma seriação de plântulas com caracteres morfológicos externos que se distribuem desde os que caracterizam *C. crenata* até aos de *C. sativa.*

Algumas destas plântulas revelam grande resistência ao fungo que provoca a doença da tinta — *Phytophthora cambivora* (Petri) Buis..

SUMMARY

On comparing the external morphology of *Castanea crenata*, *C. sativa* and a spontaneous form of *Castanea* which appeared in the same locality where the two former species live under cultivation, we were led to conclud that the spontaneous form is an hybrid between *C. crenata* and *C. sativa.* Similarly the karyologic study of the hybrid and its parents led us to the same conclusions.

The study of F_2 shows that a segregation of the parental characters takes place and that between the phenotypes there exists a series of seedlings with external morphologic characters which range from those which characterise *C. crenata* to those of *C. sativa.* Some of these seedlings show great resistance against the fungus which causes the «ink disease» — *Phytophthora cambivora.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido concluido se não fôssem as facilidades concedidas pelo Ex.mo Professor Doutor EUSÉBIO TAMAGNINI colocando ao nosso dispor todo a material de que careciamos. Aqui lhe patenteamos o nosso mais sincero reconhecimento.

Queremos também agradecer ao Ex.mo Professor Doutor ABÍLIO FERNANDES o auxílio e interesse que sempre nos dispensou durante a execução deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

CAMUS, A

1929 *Les chataigniers Monographie des genres Castanea et Castanopsis.* Paul Lechevalier. Paris.

JARETZKY, R.

1930 In «*Planta*» **10**: 120.

JENSEN, H. W.

1938 The significance of meiotic irregularities in hybrids. The theory of cyto-nuclear harmony. *Cytologia* **8**: 481-496.

NATIVIDADE, J. V.

1936 Estudo histológico das peridermes do híbrido *Quercus Ilex* × *Q. Suber*, P. Cout. *Pub. Dir. Ger. Serv. Flor. Aqüíc.* **3**: 343-368.

1944 *Bases para um plano de reconstituição, valorização e defesa dos Soutos.* Alcobaça (Dactilografado).

1945 Em defesa do castanheiro. O plano de reconstituição dos soutos portugueses. *Bol. Junta Nac. Frutas* **5** (3): 3-11 e (4): 3-14.

RODRIGUES, A.

1945 Os estudos de filometria e de carpometria na caracterização das plantas de interesse florestal ou frutífero. *Agron. Lusit.* **7** (2): 159-189.

SAX, K.

1935 The cytological analyses of species hybrids. *Bot. Rev.* **1**: 100-114

UMA BACTERIOSE VASCULAR DA BATATEIRA

(*BACTERIUM SOLANACEARUM*, E. F. SMITH)

POR *ANTÓNIO DE MATOS MORAES*
(Engenheiro Agrónomo)

INTRODUÇÃO

A doença de que nos vamos ocupar é designada no nosso país por « doença do sono », « mal murcho » e, mais frequentemente, por « pús da batateira ».

De conhecimento não muito antigo no nosso país, a sua expansão foi extraordinàriamente rápida, como se verá em capítulo seguinte, e os prejuizos causados à cultura da batata têm sido de tão grande vulto, especialmente em certos concelhos, que ocioso será encarecer a importância dos estudos que possam fazer-se sobre esta doença.

Em Janeiro de 1943, numa série de artigos, MATILDE BENSAUDE sugere que o agente causador, no nosso país, da bacteriose anular da batateira é o *Phytomonas sepedonica.*

Em Dezembro do mesmo ano, numa tese apresentada ao I Congresso Nacional de Ciências Agrárias, e depois publicada (1945), MONIZ DA MAIA e M. L. D'OLIVEIRA indicam a possibilidade de se poder identificar o organismo causador da doença no nosso país, com a var. *asiaticum* do *Bact. solanacearum*, E. F. Smith.

No nosso trabalho, procurou-se coligir o maior número de material possível, de todas as regiões do país, e, em todos os isolamentos feitos, depois de comprovada a sua patogenecidade, fazer uma distinção específica entre o *Corynebacterium sepedonicum* e o *Bact. solanacearum.*

Procurou-se em seguida fazer uma identificação completa dum certo número de culturas, não só para a sua perfeita identificação, como também para determinar se o agente patogénico pertencia, em todo o país, à mesma estirpe.

Além da sua identificação, quiz ver-se até que ponto variava a susceptibilidade de quarenta e cinco variedades comerciais de

batata e quais os hospedeiros do organismo, como bases para as necessárias medidas preventivas.

A sobrevivência do organismo no solo também por nós foi encarada, ainda que em período bastante curto.

Finalmente procurou-se determinar a presença de qualquer princípio lítico nos tecidos do hospedeiro e nos meios de cultura, capaz de explicar certas anomalias, tanto mais que para certas estirpes de *Bact. solanacearum* foi isolado um bacteriófago (MATSUMOSO e OKALIE, 1935, 1937 e KAWAMURA, 1940). Êste último aspecto, porém, não foi possível esclarecê-lo.

O presente trabalho foi realizado no departamento de fitopatologia da Estação Agronómica Nacional, e subsidiado pela Junta Nacional das Frutas, durante o tempo que medeia entre Junho de 1944 e Maio de 1946.

Queremos agradecer ao Prof. ANTÓNIO CÂMARA as facilidades concedidas para a realização do presente trabalho nos laboratórios da E. A. N.

À Dr.ª M. L. D'OLIVEIRA e ao Prof. A. L. BRANQUINHO D'OLIVEIRA, sob a orientação dos quais foi feito este trabalho, os nossos melhores agradecimentos pelo interesse e crítica sempre prestados no decorrer das investigações e pelo auxílio constante que nos prestaram.

HISTÓRIA DA DOENÇA NO NOSSO PAÍS SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NACIONAL E MUNDIAL

Não foi possível localizar a data da introdução desta doença no nosso país.

Segundo MAIA E OLIVEIRA (1943) o primeiro foco apareceu no concelho de Arouca (Douro), por volta de 1929, mas só chegou ao conhecimento dos técnicos em Janeiro de 1939, por uma carta enviada à Estação Agrária de Viseu pelo Padre Adriano de Sousa Moreira. Segundo BENSAÚDE (1943), a Repartição dos Serviços Fitopatológicos foi notificada pela ocorrência deste mal em 1936, por uma carta dum professor primário de S. Martinho dos Mouros.

De 1939 a esta parte a disseminação da doença tem sido extraordinàriamente rápida, e não existe hoje pràticamente nenhuma região de batata do País onde ela não tenha aparecido com maior

ou menor intensidade. Desde concelhos do extremo Norte, como Monção, até concelhos do extremo Sul, como Faro e Tavira, a doença foi já assinalada. Nos próprios núcleos de produção de «batata-semente» foram localizados focos, nomeadamente em Negrões e Serra do Alvão, o que levou à pronta e enérgica intervenção da Repartição dos Serviços Fitopatológicos. Podem-se, no entato, indicar os concelhos de Covilhã, Caria, Lamego e seus limítrofes, como os mais severamente inquinados pela doença, que nalguns casos tem revestido um carácter verdadeiramente alarmante.

Mundialmente a doença tem também uma enorme amplitude. Conhecida por «Brown rot of Solanaceae», «slime disease», «brown ring disease», «bacterial wilt», «mattery eye», «southern brown rot», «granvile wilt», «murcha bacteriana», ela foi já indicada em grande número de países, entre os quais, E. U. A., México, Trinidad, Guiana Inglesa, S. Vicente, Porto Rico, S.ta Luzia, Argentina, Paraguai, Noruega, Inglaterra, Suiça, Austria, Rússia, França, Índia, Malaia, Java, Sumatra,Nova Zelândia, Austrália, Filipinas, China, (ELLIOT, 1930), Japão (TAKIMOTO, 1940), Indostão (HEDAYETULLAH e SABA, 1941), Líbia (ALENCAR e DRUMOND, 1944), Canadá (SAVILE, 1937), Venezuela (MILLER, 1941), República Domicana (ROGER, 1938), S. Domingos (MENOR, 1939), Brasil (ALENCAR e DRUMOND, 1934), Madagascar (BOURIQUET, 1934), Marrocos (LABROUSSE, 1933), Ceilão (DAVIDSON, 1935, PARK, 1935), Itália (SMITH, 1914, PETRI, 1935), Alemanha (SMITH, 1914), Espanha (ANON., 1927).

O agente causal foi pela primeira vez estudado por SMITH (1896) sob o nome de *Bacillus solanacearum*, e mais tarde, 1914, sob o nome de *Bact. solanacearum*.

Numerosas têm sido as variações observadas nesta bactéria nos diferentes países, referidas por varíos investigadores, quer nos hospedeiros, quer na sintomatologia ou nas características morfológicas, culturais e fisiológicas. À medida que se forem descrevendo os nossos ensaios se irão indicando as discordâncias com os principais trabalhos, referentes ao organismo.

SINTOMATOLOGIA NA BATATEIRA

A doença manifesta-se sob dois aspectos: um nos tubérculos e outro na parte aérea.

Nos tubérculos, quando cortados, observa-se uma ligeira colo-

ração no anel vascular, donde sai um exsudato creme, leitoso, principalmente se o tubérculo é comprimido entre os dedos. Este exsudato, constituido por massas bacterianas, é maior ou menor conforme o grau de infecção (Est. I, fig. 1, e 2). Nos primeiros estádios desta, só uma forte pressão nos tubérculos nos permite observar a sua contaminação.

É também frequente, num grau mais adiantado de infecção, as massas bacterianas saírem pelos olhos dos tubérculos e aí aparecerem partículas terrosas, como que coladas (Est. I, fig. 3). Este sintoma é bastante característico, pois parece ser diferencial da doença causada pelo *Corynebacterium sepedonicum*, (EDDINS, 1939 b).

Foram os sintomas descritos que, entre nós, vulgarizaram o nome de «doença do pús» (MAIA E OLIVEIRA, 1943).

Os tubérculos, aparentemente sãos, podem-se conservar durante semanas em local fresco e seco, mas, desde que se encontrem num ambiente quente, apodrecem, apresentando um cheiro nauseabundo. Logo ao arranque se encontram por vezes tubérculos nestas condições. Este facto não é caraçterístico da doença, mas sim devido ao ataque subsequente de outros organismos.

Na parte aérea observa-se o emurchecimento parcial ou total, quase sempre sem um prévio amarelecimento da folhagem. Os folíolos começam a apresentar-se flácidos, murcham e depois secam. Muitas vezes, antes de qualquer emurchecimento, observa-se uma epinastia das folhas.

A morte das plantas é mais ou menos rápida, conforme decorrem as condições ambientais.

Em dias quentes, quando por vezes se fazem copiosas regas, é frequente a murchidão total das plantas em dois ou três dias.

Se se fizer um corte transversal duma haste de batateira atacada, observa-se também, como nos tubérculos, a exsudação duma massa viscosa, saindo dos vasos, constituida por cirros de bactérias.

Nunca entre nós foi observada a coloração castanha dos feixes vasculares, a não ser nos tubérculos, qualquer que fôsse o grau de infecção da planta.

Note-se que este sintoma é apontado por quase toda a literatura como característico da doença causada pelo *Bact. solanacearum*.

MAIA E OLIVEIRA (1943), também nunca o observaram no nosso País.

MATERIAL E MÉTODO DE ISOLAMENTO

As culturas estudadas no presente trabalho foram isoladas de material enviado à E. A. N. pelas seguintes entidades: Brigada Técnica de Aveiro; Delegação de Coimbra da mesma brigada; Posto Agrário de Sotavento — Tavira; Delegação de Tomar da

ORIGEM DAS CULTURAS

Designação das culturas	Proveniência
A_1	Brigada Técnica de Aveiro
C_3	Brigada Técnica de Aveiro, delegação de Coimbra
T_1	Posto Agrário de Sotavento — Tavira
S	Brigada Técnica de Santarém, delegação de Tomar
F_2	Brigada Técnica da Guarda, delegação do Fundão
F_5	Castelo-Novo
M_2	Moncorvo
CV_2	Covilhã
V_1	Brigada de Viseu
L_3	Campos de Coura
VP_2	Vila Nova de Paiva
B_2	Cabeceiras de Basto (Bucos)
L_5	Leiria
T_4	Trancoso
NC_1	Vila Nova de Cerveira
T_8	Covilhã
L_8	Lamego
D_2	Mina de S. Domingos

Brigada Técnica de Santarém; Delegação do Fundão da Brigada Técnica da Guarda; da mesma delegação, colhido em Castelo-Novo; Brigada Técnica de Mirandela, colhido em Moncorvo; por um particular da Covilhã; Brigada Técnica de Viseu; Brigada Técnica de Lamego, colhido nos campos de Coura; da mesma Brigada, colhido em Vila Nova de Paiva; Grémio da Lavoura de Cabeceiras de Basto colhido na freguesia de Bucos.

Do isolamento deste material seleccionaram-se 12 culturas,

das quais se perderam 4. A experimentação completa recaíu sobre as 8 culturas, designadas no quadro anterior por A_1, C_3, T_1, F_2, S, CV_2, L_3 e V_1.

Fizeram-se além disso isolamentos de material de mais as seguintes origens, nos quais sòmente foi comprovada a forma, motilidade e reacção de Gram: Leiria; Brigada Técnica da Guarda, colhido em Trancoso; Grémio da Lavoura de Vila Nova de Cerveira; Covilhã; Lamego; Mina de S Domingos.

Todos os isolamentos foram feitos a partir da massa de bactérias exsudada pelos feixes vasculares dum tubérculo recentemente cortado.

Preparou-se uma suspensão em água destilada destas bactérias, fazendo-se as placas em gelose de batata, pelo método do reticulado e por diluição. As placas foram incubadas a 27° C. e ao quarto dia fez-se a repicagem para tubos de gelose de batata inclinada, e para tubos de caldo de batata, que por sua vez foram incubados a 27° C.

A cultura de *Corynebacterium sepedonicum* usada nalguns ensaios deste trabalho, é uma cultura existente na E. A. N. da colecção do Dr. W. J. DOWSON e trazida de Cambridge pelo Prof. RAÚL CABRAL.

ANATOMIA DAS PLANTAS DOENTES

Os estudos histológicos realizaram-se em batateiras e tomateiros inoculados com as culturas CV_2 e T_1. O fixador mais usado foi o de Chamberlain. O material fixado, depois de desidratado e clarificado, foi incluido em parafina pela técnica usual. Os cortes foram feitos com espessuras de 10 a 18 micra. As colorações usadas foram safranina e «light green» (em óleo de cravo) e a de STOUGHTON, (1930).

Com a primeira obtiveram-se melhores resultados.

A bactéria foi encontrada fundamentalmente nos faixes vasculares, tanto nas raízes como nos caules.

Nos vasos do xilema forma grandes massas que dificulta ou impede o movimento da seiva. Pelo ataque de muitos feixes, a planta mostra sintomas de emurchecimento.

Mas não só nos vasos foi encontrada a bactéria. Nos tecidos

que os envolvem, forma por vezes cavidades bacterianas, que têm a sua origem em vasos cujas paredes se romperam ou foram dissolvidas. Então a bactéria passa a encontrar-se nos espaços intercelulares.

A migração das bactérias é principalmente vertical, e nos dois sentidos.

O excessivo e prematuro desenvolvimento de raizes incipientes nos tomateiros é tratado no capítulo «Inoculações experimentais». Apresenta-se aqui um corte transversal numa dessas raízes que se vê estar em ligação com os tecidos atacados (Est. II, fig. 7).

O ORGANISMO PATOGÉNICO

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Forma e tamanho

As bactérias têm a forma de bastonêtes, arredondados nas extremidades. Aparecem isoladas ou aos pares, unidas pelos extremos. Raramente em cadeias.

As dimensões foram determinadas em gota pendente, entre lâmina e lamela e em material corado com fucsina fénica diluida, usando culturas de 24 horas, crescendo em gelose de batata. Foram encontrados os seguintes valores limites:

$$1{,}2 - 1{,}5 \times 0{,}5 - 0{,}6\ \mu$$

Motilidade

As bactérias são móveis. Para a coloração dos flagelos usaram-se os métodos de MUIR e GRAY. Com este último obtiveram-se melhores resultados.

Observou-se sempre a existência dum único flagelo polar. É também este o número indicado por SMITH (1914, 1920), e por MAIA E OLIVEIRA, (1943), para o organismo que estudaram. DOWSON (1939), usando o método de Morton, indica 1 a 5 flagelos para as estirpes de *Bact. solanacearum* com que trabalhou. É esta a única referência que encontrámos, apresentando o *Bact. solanacearum* como possuindo mais que um flagelo.

Cápsula

Usou-se o método de Muir. Nunca se observaram formas capsuladas.

Esporos

Como descreve CUNNINGHAM (1924), pelo aquecimento a 80° C. verificou-se serem bactérias não esporuladas.

Reacção de Gram

Comprovadamente negativa, em qualquer idade e meio onde cresçam.

Ácido-resistência

Negativo.

CARACTERES CULTURAIS

As colónias foram observadas em placas, feitas pelo método do reticulado, e conservadas à temperatura de 27° C.

Foram incubados tubos de gelose inclinada à mesma temperatura, durante 24 horas, e em seguida mudados para o meio ambiente.

O tipo de colónia foi sempre o mesmo, quer nas placas feitas com isolamentos directos de material infectado, quer nas feitas a partir de culturas puras.

O organismo mostrou completa ausência de crescimento nos seguintes meios: gelose de malte, gelose de cenoura, gelose de levedura, gelose de batata glucosada a 2 %. Verificou-se crescimento nos outros meios empregados, sendo o óptimo observado em gelose de batata e em gelose de infusão de carne fresca. Experimentaram-se dois meios especiais, visando com um o aproveitamento da asparagina como fonte única de carbono e azoto, e com outro a inibição de crescimento das bactérias Gram — negativas.

Gelose de batata simples

Placas — O crescimento aparece após 48 horas, sendo visíveis ao terceiro dia as colónias bem isoladas. Apresentam-se redondas, planas, brancas, dum branco ligeiramente anilado quando vistas à transparência, de margem inteira, opacas, de 1-1,5 mm de diâmetro.

Após 14-15 dias tornam-se acastanhadas, perdendo a opacidade e ficando transparentes.

Tubos de gelose inclinada — O crescimento aparece no segundo dia, com margem inteira, pouco elevado, tornando-se ligeiramente acastanhado com o tempo

Gelose de infusão de carne fresca

Placas — Tempo de crescimento sensivelmente igual ao do meio anterior. Colónias redondas, planas, vistas à transparência dum branco sensívelmente mais anilado que no meio anterior, de 1,5 mm de diâmetro, opacas. Aparecimento do pigmento castanho após algum tempo.

Tubos de gelose inclinada — Bom crescimento, com maior elevação que no meio anterior.

Dextrose (Difco)

Placas — Razoável crescimento neste meio, inferior, no entanto, ao dos meios anteriores. As colónias apresentam-se redondas, margem inteira, de 1,5-2 mm de diâmetro, branco-creme, e com estrutura interna « Wrinkled » (CUNNINGHAM, 1924).

Carne (Difco)

Placas — Bom crescimento neste meio. Colónias perfeitamente redondas, brancas ou ligeiramente aniladas quando vistas à transparência, opacas, planas, com pouco mais de 1/2 mm de diâmetro.

Cilindros de batata

Crescimento visivel passadas quarenta e oito horas.

Creme, liso, brilhante. Com o tempo tornando-se acastanhado, observando-se ao décimo terceiro ou décimo quarto dia grande quantidade de pigmento castanho.

Solução de Cohn

Não se observou crescimento neste meio, que se manteve em observação durante dois meses.

Solução de Fermi

Igual resultado ao do meio anterior.

Solução de Ushinsky

Apareceu uma ligeira turvação do meio ao fim do quinto dia, aumentando sensívelmente nos dias seguintes. Ao décimo segundo dia era visível grande desenvolvimento. A cultura CV_2 foi a primeira a turvar o meio, mas ao décimo segundo dia a turvação era sensívelmente igual em todas as culturas.

Meio sintético de Asparagina

SMITH (1914, 1920) aponta varios casos do uso dum meio sintético de asparagina, tendo esta como única fonte de azoto. A asparagina, como única fonte de carbono e azoto pode ser considerada como uma característica de valor, para a classificação das bactérias fitopatogénicas (CLARA, 1934, BURKHOLDER, 1939, STARR e WEISS, 1943).

Embora não se discuta o aspecto de classificação, relatamos aqui os resultados referentes a este ensaio. Utilizámos a técnica seguida por STARR e WEISS (1943). Todas as nossas culturas cresceram bem nas repetidas repicagens, quatro, num meio sintético, contendo asparagina. Este mesmo resultado foi obtido por STARR e WEISS (1943) para o *Pseudomonas solanacearum*. Fizeram-se também ensaios culturais com o *C. sepedonicum*, com resultados negativos. Afirmam aqueles autores que as espécies fitopatogénicas do género *Corynebaterium*, com uma única excepção, *C. fascians*, não crescem neste meio.

Meio contendo dicromato de potássio

MALLMANN (1941) observou que o dicromato de potássio inibe o crescimento das bactérias gram-negativas, permitindo o das gram-positivas. Baseados neste facto, MARTEN e outros (1943), utilizaram um meio diferencial para isolar o *C. sepedonicum*.

Este meio é fundamentalmente constituido pelo meio de Burkholder (BULKHOLDER, 1938) e por uma solução a 1:1000 de dicromato de potássio.

Nos nossos ensaios quiz ver-se até que ponto crescia neste meio a cultura de *C. sepedonicum*, e se o crescimento das culturas estudadas era de facto inibido. Para isso empregou-se a técnica de MARTEN e outros (1943).

Verificou-se a inibição de crescimento, neste meio, das nossas culturas e o desenvolvimento da cultura de *C. sepedonicum*.

CARACTERES FISIOLÓGICOS

Relações com o oxigénio livre

Todas as culturas ensaiadas mostraram-se estritamente aeróbias. As inoculações feitas num meio de agar com 2 % de dextrose, quer em «shake», quer em «stab», apresentaram crescimento sòmente à superfície.

MAIA e OLIVEIRA (1943) indicam o organismo que estudaram como aeróbio facultativo. No «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (1930) o *Phytomonas solanacearum* é tambêm apontado como aeróbio facultativo. SMITH (1914, 1920) aponta o *Bact. solanacearum* como estritamente aeróbio. A pp. 196 do seu 3.° volume (1914) diz: «If it is ever capable of growing in the absence of air we do not know on what media or under what circunstances. All of the common media have been tried and in all of them it requires free oxigen for respiration».

Na mesma página lê-se que todas as experiências dos numerosos autores mostram que o *Bact. solanacearum* é estritamente aeróbio. Também ELLIOT (1930) aponta esta bactéria como aeróbia.

Redução de nitratos

Usaram-se tubos contendo água de peptona com nitrato (CUNNIGHAM, 1924). Em cada um deles inverteu-se um tubo Durham de fermentação. Para as inoculações utilizaram-se culturas de quarenta e oito horas, crescendo em gelose de batata, e seguidamente fez-se a incubação a 27° C. As culturas foram mantidas a esta temperatura durante sete semanas, tendo sido feitos ensaios a diferentes intervalos, como mostra o quatro seguinte. Para a pesquisa dos nitritos usou-se o reagente de Ilosway (ácido sulfanilíco e α-naphtilamina-)-(CUNNINGHAM, 1924). Além deste reagente, usou-se no último ensaio o reagente de Trommsdorf, que só indica fortes reduções de nitratos.

Como se vê no quadro apresentado, todas as culturas reduziram os nitratos, variando ligeiramente o seu poder redutor. Nenhuma produziu gaz. Para testemunhas usaram-se tubos com o

meio não inoculado e tubos inoculados com uma bactéria isolada dum melão com «soft-rot», existente na E.A.N. (OLIVEIRA, 1943), e que é fortemente redutora de nitratos.

ACÇÃO SOBRE OS NITRATOS

Culturas	5.º dia	10.º dia	15.º dia	3 semanas	5 semanas	7 semanas
A_1	—	+	+	+ +	+ +	+ + +
C_3	—	—	—	+ +	+ +	+ + +
T_1	—	+	+	+ +	+ + +	+ +
F_2	—	+	+	+	+ + +	+ + +
S	—	+	+	+ +	+ + +	+ + +
CV_2	—	+	+	+ +	+ + +	+ +
L_3	—	—	+	+ +	+ +	+ + +
V_1	—	+	+	+ +	+ + +	+ + +
Melão	—	+ +	+ +	+ + +	+ + + +	+ + + +

— Nitratos não reduzidos
\+ Nitrados fracamente reduzidos (rosado)
\+ + Nitratos medianamente reduzidos (rosa vivo)
\+ + + Nitratos fortemente reduzidos (vermelho)

Produção de amónia

O reagente de Nessler não acusou presença de amónia.

As culturas foram inoculadas no meio atrás referido. Foi também o resultado de MAIA E OLIVEIRA (1943). ELLIOT (1930) e DOWSON (1939) apontam o *Bact. solanacearum* como produzindo amónia.

Formação de indol

A pesquisa do indol fez-se em água de peptona, pela técnica de Ehrlich-Böhm (para-dimetilamina-benzaldeido e persulfato de potássio) e pela técnica de Gnezda (ácido oxálico).

Todos os ensaios referentes às diversas culturas foram nega-

tivos. Usou-se como testemunha uma cultura de *Bact. coli*, que deu resultados positivos.

Produção de ácido sulfídrico

Usou-se, para esta determinação, a seguinte técnica: tiras de papel de filtro, embebidas em acetato de chumbo, esterelizadas a 120° e secas, foram colocadas nos tubos prèviamente inoculados. Os meios usados foram caldo de extrato de carne e também água de peptona. Em todas as culturas foi verificada a produção de ácido sulfídrico.

Liquefacção de gelatina

Nenhuma das culturas inoculadas em gelatina «stab» e incubadas à temperatura de 10° C., liquefez este meio. As culturas foram mantidas durante sete semanas. Usaram-se como testemunhas tubos não inoculados e tubos inoculados com *E. caratovorum* que liquefez o meio.

Acção sobre o amido

Existe certa discordância nos resultadios de vários autores em referência a este ensaio.

BERGEY (1930) apresenta o *Bact. solanacearum* como não hidrolizando o amido. MAIA E OLIVEIRA (1943) também dão este ensaio como negativo, para o organismo que estudaram. SMÎTH (1914), no entanto. diz que o *Bact. solanacearum* não destroi todo o amido, mas que parte dele é convertido em amilodextrina, produzindo uma reacção vermelha com a iodina. ELLIOT (1930) diz produzir uma ligeira acção diastásica. DOWSON (1939) obteve tambem resultados positivos com a cultura que estudou.

Nos nossos ensaios usaram-se culturas num meio líquido de infusão de carne fresca, contendo 0,2 % de amido solúvel. As culturas foram incubadas a 27° C. Ao quarto dia colocava-se uma gota do meio numa lâmina, a que se juntava uma gota de solução de iodína (I 1 gr., KI 2 grs., água 200 c. c.).

A reacção deu uma cor vermelho-acastanhada, o que indica uma parcial hidrolização. Ensaios feitos em dias seguintes deram o mesmo resultado.

Concluiu-se, portanto, que as nossas culturas têm uma parcial acção diastásica.

Leite simples

As nossas culturas não coagularam o leite. Notou-se uma peptonização progressiva que começou ao décimo quarto e décimo quinto dia. Ao fim de cinco a seis semanas a peptonização era completa, tornando-se o leite transparente.

Leite tornesolado

As nossas culturas não acidificaram este meio, nem reduziram o tornesol. Ao décimo primeiro dia notou-se um azul mais intenso e esta alcalinidade foi aumentando com o tempo. Passado um mês, o meio apresentava uma côr fortemente azulada escura em relação aos tubos testemunhas.

Reside aqui a principal diferença entre as nossas culturas e o organismo estudado por MAIA e OLIVEIRA, (1943). Nos ensaios destes autores o organismo acidificou o meio, e daí a sua identificação estar mais próxima da var. *Asiaticum* do *Bact. solanacearum*, E. F. Smith. Esta variedade, no entanto, é indicada por SMITH como avermelhando o meio de leite tornesolado não desnatado. Nos nossos ensaios usou-se sempre leite desnatado.

Como os resultados são mais precisos usando como indicador púrpura de bromo-cresol (CLARK e LUBS, 1917), foi utilizado nos nossos ensaios, tendo-se obtido os mesmos resultados.

Leite com púrpura de bromo-cresol

As nossas culturas não mostraram qualquer acidificação deste meio. Pelo contrário, ao décimo quinto dia, apresentavam reacção alcalina. Esta era notàvelmente visível do vigéssimo oitavo dia em diante.

Acção sobre os compostos de carbono

O estudo da capacidade fermentativa das culturas estudadas nos diferentes compostos de carbono, foi feito com culturas de quarenta e oito horas, crescendo em gelose de batata, e usando um meio sintético (Manual of Methods II-36:14). A este meio juntou-se 1 % de cada um dos compostos de carbono adiante mencionados. Cada tubo de ensaio continha 10 c. c. do meio assim constituido e um tubo Durham de fermentação. Como indi-

cador usou-se púrpura de bromo-cresol. O pH do meio foi ajustado a 7. 0.

Como certos compostos de carbono se podiam alterar pelo calor, o meio sintético foi esterilizado no autoclave, e aqueles compostos esterilizados por filtração num filtro Seitz, e em seguida adicionados assèpticamente àquele meio.

Antes de serem usados, todos os tubos foram incubados a 33° durante uma semana. Os tubos, depois de inoculados, foram incubados a 27° C., e guardados durante oito semanas, passado as quais o ensaio considerou-se terminado.

Ensaiaram-se os seguintes compostos de carbono:

Monossacaridos	— xilose, galactose, manose, dextrose
Dissacaridos	— lactose, sacarose e maltose
Polissacaridos	— inulina
Alcoóis	— glicerol, manitol e adonitol
Glucosidos	— salicina e aesculina.

Em nenhum dos compostos de carbono atrás referidos houve produção de gás, o que está conforme com toda a literatura referente ao *Bact. solanacearum*. Outro tanto não sucede com a acidificação. Para vários autores o *Bact. solanacearum* não acidifica certos compostos de carbono, que nos nossos ensaios mostraram ser acidificados. Particularmente, o organismo estudado por MAIA E OLIVEIRA (1943), e referímo-nos a este trabalho por ser o único que incidiu sobre material colhido no nosso País, não acidificou sacarose, glucose, levulose, lactose e maltose. Estes autores usaram como meio água de peptona e o indicador de Andrade. Com este método de trabalho também as nossas culturas não acidificaram nenhum dos treze compostos de carbono ensaiados.

Porém, e como se vé no quadro adiante apresentado, o resultado foi bem diferente, usando outro meio e outro indicador, já atrás referido.

Esta diferença de resultados pode-se interpretar em virtude dos organismos produzirem pequenas quantidades de ácido, não reveláveis pelo indicador de Andrade, menos sensível que a púrpura de bromo-cresol, acrescentado ao facto de num caso se usar um meio com uma substância de certo modo tamponisante — a peptona.

DOWSON (1939), trabalhando com o mesmo meio e com o

mesmo indicador que se usou neste trabalho, na segunda fase dos ensaios, obteve os mesmos resultados que adiante se apresentam para os compostos de carbono que ensaiou: xilose, dextrose, manose, lactose, maltose, glicose e salicina.

Pelo quadro, vê-se que todas as culturas tiveram igual comportamento.

ACÇÃO SOBRE OS COMPOSTOS DE CARBONO

	Compostos de carbono	CULTURAS								
		A_1	C_3	T_1	F_2	S	CV_2	L_3	V_1	B. aerogenes
Monossacaridos	Xilose	—	—	—	—	—	—	—	—	+ +
	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
Dissacaridos	Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
Polissacaridos	Inulina	—	—	—	—	—	—	—	—	+ +
Alcoois	Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	Manitol	—	—	—	—	—	—	—	—	+ +
	Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+ +
Glucosidos	Salicina	—	—	—	—	—	—	—	—	+ +
	Aesculina	—	—	—	—	—	—	—	—	+ +

— Não acidificado
\+ Acidificado
++ Muito acidificado.

Para termo de comparação usou-se o *B. aerogenes*, da E. A. N., que além de produzir gás, tem um poder acidificante bastante maior, como mostra o quadro.

Resistência à secura

O problema da resistência à secura apresenta muito interesse no estudo deste organismo. De facto, temos sempre observado que a frequência da doença é menor nas culturas de batata de sequeiro que nas de regadio, e que a falta de água diminui a intensidade da doença.

Este facto, observado por vários autores, entre eles SMITH (1914), WEBER (1923), WAGGER (1931), DAVIDSON (1935), EDDINS (1936 b), ALENCAR e DRUMOND (1944), etc.. pode evidentemente ser atribuido a que a água seja um fácil veículo da bactéria, mas também é de considerar a sua maior ou menor resistência à secura.

Com este objectivo, realizaram-se os ensaios a seguir descritos.

O método usado foi o descrito por CABRAL (1944).

As vantagens deste método em relação ao de LEWIS (1914) são evidentes e por isso o ter sido seguido. Introduziu-se, no entanto, uma ligeira modificação. CABRAL utilizou bastonêtes de vidro direitos e nós fizemos-lhes uma curvatura nas pontas, sensìvelmente de 60°, para melhor se segurarem à vareta da placa de secura.

O método consistiu fundamentalmente no seguinte: cortaram-se varetos de vidro, com um diâmetro aproximado de 4 mm, em bastonêtes de 5 cm de comprimento. A estes fez-se a curvatura atrás indicada. Seguidamente foram cuidadosamente desengordurados e lavados, posto o que só se lhes tocava com o auxílio de pinças. Estes bastonêtes foram depois colocados em placas de Petri, doze em cada, e o conjunto esterilizado.

Culturas de quarenta e oito horas, crescendo em caldo de batata, foram vasadas nas placas, sobre os bastonêtes, usando sensìvelmente o líquido dum tubo para cada placa. Os bastonêtes foram então transferidos para outras placas de Petri esterilizadas, que tinham a todo o seu diâmetro uma vareta de vidro não assentando no fundo da placa, e onde se prendiam as curvaturas dos bastonêtes. Estes ficavam assim inclinados para um e outro lado da placa, não contactando entre si.

Antes da transferência, deixaram-se escorrer bem, para que não arrastassem muito líquido. As placas de secura foram

guardadas em estufas à temperatura de 27° C., e durante quatro horas as tampas ligeiramente levantadas, com auxìlio de plasticina, para que não houvesse grande acumulação de humidade.

A intervalos regulares os bastonêtes foram tirados das placas para tubos com caldo de batata, que seguidademte foram incubados a 27°.

Nos primeiros ensaios, estes intervalos foram de três dias, durante a primeira semana. Como não se notasse nenhuma turvação nos tubos, encurtou-se o tempo, até que foi observado crescimento.

Todos os bastonêtes mudados nas primeiras doze horas turvaram o meio de cultura. Ás vinte e quatro horas só já foi observada turvação para alguns. Além de quarenta e oito horas nenhum bastonête turvou o meio de cultura, tempo que foi considerado como máximo de resistência à secura, segundo a técnica adoptada.

Se se compararem os resultados obtidos com os de CABRAL (1944) para o *X. begoniae*, vê-se que as nossas culturas têm uma pequeníssima resistência à secura, pois que aquele autor determinou sessenta e cinco dias como máximo de resistência à secura das culturas de *X. begoniae* por ele estudadas. SMITH (1914), molhando lâminas com culturas novas de *Bact. solanacearum* crescendo em água de peptona, e guardando-as numa placa de Petri à temperatura ambiente, verificou que todas as culturas morriam além do sexto dia.

Por estes resultados, parece que a pequena resitência à secura do organismo estudado explicará, de certo modo, a menor intensidade da doença quando falta a água na cultura das plantas.

Longevidade nos meios de cultura

O período de longevidade das nossas culturas é bastante curto. Nos meios sólidos usuais de cultura, as repicagens tinham de se fazer todos os quinze dias, porque feitas em períodos mais longos perdiam a viabilidadde. Foi no meio de caldo de carne e em leite que as culturas apresentaram maior longevidade — trinta e cinco dias.

Nós conservámo-las durante 2 ½ meses a temperaturas baixas, 5° C., em que o crescimento era impedido, e mudávamo-las passado este tempo para a temperatura de 27° C., aparecendo crescimento em quarenta e oito horas.

Temperatura mínima de crescimento

Inocularam-se oito tubos de caldo de batata, para cada uma das nossas culturas, que se dividiram em quatro lotes de dois tubos cada, e que foram conservados às temperaturas de 4°, 6°, 8° e 10° C.

Todas as culturas tiveram o mesmo comportamento.

À temperatura de 10° C. foi visível, ao quinto dia, um ligeiro crescimento, que se tornava abundante ao décimo.

À temperatura de 8° C. nenhum crescimento foi observado durante os dois meses que as culturas estiveram em observação. O mesmo resultado se verificou nos tubos conservados às temperaturas 4° e 6° C.

A temperatura mínima de crescimento foi assim localizada entre 8° e 10° C.

A maioria dos autores apontam, para o *Bact. solanacearum*, uma temperatura mínima de crescimento ligeiramente superior àquela. Assim, SMITH (1914), diz ser cerca de 10° C., MEIER e LINK (1923) dizem que à temperatura de 12° C. o crescimento é virtualmente impedido.

Temperatura óptima de crescimento

Usaram-se tudos de igual diâmetro, deitando em cada um 8 c. c. dum meio neutro de caldo de batata, e inocularam-se com uma ansa de cultura de quarenta e oito horas. Para cada temperatura foram incubados quatro tubos de cada cultura. As temperaturas de incubação foram 23°, 25°, 27°, 30° e 33° C.

O melhor e mais rápido crescimento foi observado a 27° C. Esta temperatura é inferior a todas as citadas na literatura. Assim, SMITH (1914), aponta uma temperatura óptima entre 35° e 37° C., MEIER e LINK (1923) entre 25° e 36° C., WAGGER (1931) 35° C., MAIA e OLIVEIRA (1943) 30° C., ALENCAR e DRUMOND (1944) entre 31° e 33° C., etc.

Temperatura máxima de crescimento

Inocularam-se oito tubos de caldo de batata para cada uma das nossas culturas e dividiram-se em quatro lotes de dois tubos cada, que se conservaram às temperaturas de 35°, 37°, 39° e 41° C.

Todas as culturas tiveram sensìvelmente o mesmo comportamento.

À temperatura de 35° C., o crescimento foi visível ao segundo dia, sendo ao quinto dia abundante. Houve também crescimento á temperatura de 37° C. A 39° C. não foi já observado nenhum crescimento. O mesmo sucedeu à temperatura de 41° C.

A temperatura máxima de crescimento foi assim localizada entre 37° e 39° C.

Os tubos que permaneciam durante cinco dias à temperatura de 39° C., apresentavam turvação em quarenta e oito horas quando transportados para a temperatura de 27° C. Outro tanto não sucedia nos tubos conservados a 41° C. Esta temperatura, durante cinco dias, destruia as culturas.

MAIA e OLIVEIRA (1943) dizem que a temperatura máxima de crescimento é de 37° C.

Temperatura letal

Para a determinação desta temperatura usaram-se tubos de aglutinação, com um diâmetro interno de 8 mm. Estes apresentam melhores condições para esta experiênçia do que os vulgares tubos de ensaio, não só pelo seu menor diâmetro interno, permitindo que mais ràpidamente se estabeleça uma temperatura uniforme em toda a coluna líquida, mas também pela menor espessura das paredes, que oferecem menor resistência à passagem do calor.

Estes tubos, contendo um meio neutro de caldo de batata, eram inoculados com uma ansa de cultura de vinte e quatro horas. Para cada cultura usaram-se doze tubos, divididos em quatro lotes, cada um dos quais era posto em banho-maria durante dez minutos, às temperaturas de 47°, 48°, 49° e 50° C.

Passado este tempo, os tubos eram ligeiramente esfriados em água corrente e depois incubados à temperatura de 27° C. As temperaturas foram controladas com dois termómetros, um mergulhado directamente no banho-maria, e o outro num dos tubos com a cultura. O tempo de exposição foi contado depois de o termómetro no interior do tubo marcar a temperatura desejada.

Todas as culturas expostas à temperatura de 47° C. apresentaram crescimento, depois de incubadas a 27° C. durante quarenta e oito horas. A temperatura de 48° C. destruiu as culturas A_1, C_3, T_1, S, CV_2 e V_1. A temperatura de 49° C. destruiu as culturas F_2 e

L_1. Vê-se assim que, para os nossas culturas, a temperatura letal está compreendida entre 47° e 49° C. MAIA e OLIVEIRA (1943) apontam, para o organismo que estudaram, uma temperatura letal compreendida ente 45° e 48° C. A maioria dos autores dizem que esta temperatura anda à volta de 52° C.

Resistência à acidez do meio

A determinação desta característica é de importância capital, porquanto nela se baseia um dos meios de combate que pode revestir altíssimo interesse prático.

Para a sua determinação usou-se caldo de batata como meio de cultura e, para a acidificação, foram usados três ácidos em concentração deci-normal: clorídrico, acético e sulfúrico. O pH do meio foi determinado, antes e depois da esterilização, com um aparelho Beckman. Os tubos foram incubados durante vinte e cinco dias à temperatura de 27° C.

O quadro seguinte indica o comportamento das diferentes culturas.

	4.01	4.08	4.15	4.35
A_1	—	+	+	+
C_3	—	—	+	+
T_1	—	—	+	+
F_2	—	+	+	+
S	—	—	—	+
CV_2	—	+	+	+
L_3	—	—	+	+
V_1	—	—	+	+

— Ausência de crescimento
\+ Com crescimento

Nas condições em que se fez o ensaio, a resistência à acidez está compreendida entre 4.01 e 4.35.

EDDINS (1936 b) diz que o agente causador do «brown rot» é destruído em caldo de batata com um pH de 4.02.

REACÇÕES SEROLÓGICAS

1) Tendo as culturas estudadas mostrado idênticas características morfológicas, culturais e fisiológicas julgou-se de grande

interesse comprovar a sua semelhança com ensaios de aglutinação. Tal semelhança foi inteiramente comprovada.

Em vista disto, e com a identidade de todos os outros caracteres pode-se concluir que as culturas estudadas são uma e a mesma estirpe.

Experimentou-se também a cultura de *Corynebacterium sepedonicum*.

Os resultados da inter-aglutinação entre as nossas culturas e aquela espécie foram negativos, como se esperava. Estas provas foram feitas sòmente por mera curiosidade, pois as diferenças morfológicas, culturais e fisiológicas existentes não podiam deixar qualquer dúvida quanto à nítida distinção entre as nossas culturas e a espécie referida.

Como complemento, procurou-se também determinar se as bactérias provocavam qualquer alteração nos animais utilizados nos ensaios, tendo-se mostrado inofensivas.

2) *Material e métodos*

A imunização foi feita em cobaias sãs, sensìvelmente da mesma idade e tamanho. Para a preparação do soro imune usaram-se quatro culturas — A_1, T_1, CV_2 e L_3, além do *C. sepedonicum*.

Utilizaram-se sempre culturas de vinte e quatro horas, crescendo em gelose de batata.

As culturas eram diluídas em soro fisiológico, à razão de uma ansa de cultura por cada c. c. de soro, e seguidamente inactivadas em água a 60° C. durante quarenta e cinco minutos; passado este tempo, deixavam-se arrefecer e injectava-se a cobaia.

A imunização foi feita por cinco injecções intra-peritoneais, a intervalos de cinco dias, e aumentando gradualmente o número de bactérias injectadas, tendo começado com uma dose de 1 c. c. e aumento de cada vez 1 c. c. Desta forma, ao fim de vinte dias, tinham-se injectado 15 c. c., dose que produziu aglutininas num título suficiente.

Ao vigésimo quinto dia o sangue tirado dos corações das cobaias foi centrifugado, para obtenção de soros imunes, procedendo-se às seguintes diluições: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/960. Seguidamente depositava-se uma ansa de cultura a ensaiar (usaram-se sempre culturas de vinte e quatro horas, crescendo em gelose de batata), em cada um dos oito tubos, fazendo-se um

ligeiro esfregaço nas paredes destes, de forma a tirar todos os grumos, e fazendo o mais homogèneamente possível a diluição. Os tubos eram depois conservados na estufa de 37° C., durante duas horas, posto o que se mudavam para o meio ambiente. Passadas vinte e quatro horas, faziam-se as leituras num aglutinoscópio.

Duas cobaias foram injectadas com as mesmas doses e pela mesma técnica, com as culturas A_1 e CV_2, não inactivadas, para comprovar se as bactérias tinham qualquer efeito na vida dos animais. Estas cobaias foram vigiadas durante quarenta dias.

Fizeram-se também ensaios de aglutinação com o soro de uma cobaia não imunizada, com o fim de mostrar que as aglutininas não estavam naturalmente presentes no sangue das cobaias.

3) *Resultados*

Os Quadros I, II, III e IV, que a seguir se apresentam, mostram provas de aglutinação sensìvelmente iguais para as oito culturas ensaiadas.

Todas elas revelaram o mesmo grau de aglutinação para as mesmas diluições; sòmente o soro obtido a partir da cultura CV_2 mostrou um poder aglutinante ligeiramente superior, mas, mesmo assim, com o mesmo título de aglutininas, $^1/_{640}$, pois a partir desta diluição em nenhuma leitura foi observada aglutinação.

Pode-se pois concluir que todas as culturas pertencem à mesma estirpe.

Outra conclusão a tirar, ainda que não extensiva a todas elas, é a perfeita homologia antigénica (TOPLEY e WILSON, pp. 157, 1931 e TOPLEY pp. 92, 1933) das culturas A_1, T_1, CV_2 e L_3. Esta conclusão só pode ser verdadeira para as culturas referidas, pois só delas se fizeram «mirror texts» (SCHÜTZE, 1920, 1921). É muito provával, no entanto, que ela seja também verdadeira para as culturas C_3, T_2, S e V_1, de tal forma se mostraram constantes as provas de inter-aglutinação. Contudo, se qualquer alteração houvesse nos «mirror texts» de qualquer destas culturas com as quatro primeiras, elas seriam sub-estirpes ou biotipos (TOPLEY e WILSON, pp. 158, 1931), e portanto o poder afirmar-se que todas pertencem à mesma estirpe.

Nos nossos ensaios observou-se que a aglutinação aumentava das diluições mais baixas até uma determinada diluição, para daí decrescer até à diluição mais elevada.

QUADRO I

Ensaios de Aglutinação

Soro obtido com a cultura A_1

Culturas	DILUIÇÕES						
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/960
A_1	±	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
C_3	±	±	+ + ±	+ + +	+ +	±	—
T_1	±	+	+ +	+ + ±	+ +	+	—
F_2	+	±	+ +	+ +	+ ±	±	—
S	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ + ±	+	—
CV_2	+ ±	+ +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
L_3	+	+	+ + ±	+ + ±	+ ±	±	—
V_1	±	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
C. sepedonicum	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO II

Ensaios de Aglutinação

Soro obtido com a cultura T_1

Culturas	DILUIÇÕES						
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/960
A_1	+	+ +	+ + +	+ + +	+ +	+	—
C_3	+ ±	+ +	+ + ±	+ + ±	+ ±	±	—
T_1	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
F_2	±	+ ±	+ +	+ +	+ ±	±	—
S	+	+ +	+ + +	+ + +	+ ±	+	—
CV_2	±	+ ±	+ + ±	+ + ±	+ +	+	—
L_3	+	+	+ + ±	+ + ±	+ ±	±	—
V_1	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	±	—
C. sepedonicum	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO III

Ensaios de Aglutinação

Soro obtido com a cultura CV_2

Culturas	DILUIÇÕES						
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/960
A_1	+ + +	+ +	+ + + ±	+ + + ±	+ +	+	—
C_3	+ ±	+ +	+ + +	+ + + +	+ + +	+	—
T_1	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
F_2	±	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	±	—
S	+ +	+ + ±	+ + + +	+ + + +	+ + ±	+ ±	—
CV_2	+ ±	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ +	±	—
L_3	+	+ +	+ + +	+ + +	+ ±	+	—
V_1	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
C. sepedonicum	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO IV

Ensaios de Aglutinação

Soro obtido com a cultura L_3

Culturas	DILUIÇÕES						
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/960
A_1	+	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
C_3	±	+ +	+ + ±	+ + ±	+ ±	+	—
T_1	+ ±	+ +	+ + + +	+ + + ±	+ +	±	—
F_2	±	+	+ + ±	+ + ±	+ ±	+	—
S	±	+ ±	+ + +	+ + +	+ +	+	—
CV_2	+	+ +	+ + + ±	+ + +	+ +	±	—
L_3	+ ±	+ +	+ + +	+ + +	+ +	±	—
V_1	+	+ +	+ + +	+ + +	+ ±	±	—
C. sepedonicum	—	—	—	—	—	—	—

A mais completa aglutinação foi às diluições $^{1}/_{80}$ e $^{1}/_{160}$ e não à diluição $^{1}/_{20}$. Não foi observada nenhuma verdadeira prozona, fenónemo citado por vários investigadores, ainda que seja possível que a diluições inferiores a $^{1}/_{20}$ ela possa existir.

O facto observado pode-se interpretar pela noção apresentada por DEAN e WEBB (1926) das proporções óptimas anticorpo: antígeno.

Estes autores trabalharam com quantidades constantes de anticorpo, sendo variáveis as quantidades de antígeno, de forma que o seu método das proporções óptimas antígeno: anticorpo deve ser referido à relação óptima de anticorpo-constante ou óptimo de anticorpo-constante.

Mas RAMON (1922) trabalhou com quantidades constantes de antígeno. Se lhe aplicarmos o método das proporções óptimas antígeno-anticorpo, de DEAN e WEBB (1926), devemos referi-lo à relação óptima de antígeno-constante ou óptimo de antígeno-constante (TOPLEY, 1933). Nas nossas experiências a expressão quantitativa deve também ser referida à relação óptima de antígeno-constante. Posto isto, vejamos o que dizem DEAN e WEBB. Estes autores, assim como RAMON, após um tempo determinado de ser feita a mistura anticorpo-antígeno, e de ser agitada, verificaram o tubo em que a floculação era mais rápida. Diz DEAN e WEBB: «os ensaios para determinar a parte residual de anticorpo e de antígeno, nos líqui-quidos sobrenadantes, depois de se ter dado a precipitação, levou-nos a concluir que as proporções óptimas são idênticas com as proporções equivalentes, isto é, que ocorre uma mais rápida floculação na mistura em que o antígeno e o anticorpo estão presentes em tais quantidades, que nenhum dos reagentes fique por combinar, ou que fique um vestígio determinável de cada reagente no líquido que sobrenada».

Existe pois uma proporção óptima antígeno-anticorpo, na qual a floculação é mais rápida.

Nas nossas experiências não se verificou exactamente a rapidez da floculação, mas o tempo que mediava entre o fazer da mistura anticorpo-antígeno e o exame dos tubos foi sensìvelmente igual, e verificou-se, como atrás se aponta, que a aglutinação foi mais completa às diluições 1/80, 1/160. Queremos concluir que, no nosso caso, são estas as proporções óptimas de aglutinação, e por isso ter-se observado o facto que se aponta.

Não nos parece ousado interpretar este facto da mesma forma

que DEAN e WEBB (1926) interpretam a velocidade de floculação. Vejamos porquê. DEAN (1917) afirma: «Em todas as reacções serológicas a consequência imediata é uma agregação das partículas de globulina, envolvendo o antígeno. O grau em que se dá a agregação ou precipitação depende das condições experimentais, *das proporções relativas de antígeno e de anticorpo existentes na mistura,...*» Já portanto, nesta data, 1917, se consideravam as proporções relativas antígeno-anticorpo como influenciando o grau em que se dá a agregação ou precipitação.

Por outro lado, observando o esquema apresentado por TOPLEY (1933) baseado nas sugestões de MILLES (1933) e nos pontos de vista de MARRACK e SMITH (1930), para interpretar os vários factos que podem suceder nas misturas em várias proporções de antígeno-anticorpo, vê-se que a interpretação para o facto que nos ocupa e que vimos procurando dar-lhe, é perfeitamente legítima.

Se se atentar agora nas explicações de HEUER (1922), de COSTA CRUZ (1929), de DUNCAN (1932), de MILLES (1933) para a existência de prozonas, baseados na relação óptima de antígeno-constante, observa-se também que o nosso facto é explicável por esta relação como se quer provar. O facto de não se ter observado nenhuma verdadeira prozona, não invalida a explicação, pois que entre a prozona e as diluições que mostram completa aglutinação, existem diluições onde aquela é parcial. Verifica-se portanto a mesma curva observada nos nossos ensaios, isto é, haver diluições mais baixas em que as aglutinações são menos completas que a diluições mais elevadas. Parece pois haver identidade de fenónemos e portanto ser possível interpretá-los da mesma maneira.

Observando agora o Quadro V, vê-se, como já foi apontado no intróito a este capítulo, que foram negativas todas as reacções de inter-aglutinação entre as nossas culturas e o soro imune preparado com o *C. sepedonicum*.

Nos outros Quadros são também negativas todas as reacções de *C. sepedonicum* com os soros imunes preparados com as culturas A_1, T_1, CV_2 e L_2.

Fica assim afastada qualquer identidade serológica entre aquela espécie e as outras culturas com que trabalhámos.

O Quadro mostra também que o *C. sepedonicum* é fracamente antigénico para as cobaias, produzindo um soro aglutinante de baixo título, pois que à diluição $^1/_{160}$ já não se observa aglutinação.

Este facto foi também notado por SNIEZKO e BONDE (1943).

Outro resultado das nossas experiências foi o de as cobaias inoculadas com culturas não inactivadas, se terem mostrado sãs e sem qualquer alteração durante os quarenta dias que foram vigiadas.

QUADRO V

Ensaios de Aglutinação

Soro obtido com a cultura de *Corynebacterium sepedonicum*

Culturas	DILUIÇÕES			
	1/20	1/40	1/80	1/160
C. sepedonicum	± + +	+	±	—
A_1	—	—	—	—
C_3	—	—	—	—
T_1	—	—	—	—
F_2	—	—	—	—
S	—	—	—	—
CV_2	—	—	—	—
L_3	—	—	—	—
V_1	—	—	—	—

Finalmente, as reacções de aglutinação feitas com soro de cobaias não imunizadas, foram negativas, o que mostra não existirem aglutininas «naturais» ou «normais» no soro das cobaias.

Do exposto, podem-se tirar as seguintes conclusões:

a) As culturas estudadas são serològicamente idênticas;
b) As reacções serológicas mostraram um tipo especial de aglutinação, explicável pela relação óptima de antígeno-constante;
c) Nenhuma identidade serológica existe entre as nossas culturas e o *C. sepedonicum*;

d) As nossas culturas são inofensivas para os animais com que se trabalhou;
e) Não foi notada presença natural de aglutininas no soro das cobaias, capazes de reagirem com as nossas culturas.

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS

Várias plantas foram inoculadas experimentalmente e expostas à infecção natural.

Estes ensaios visaram não só o estabelecimento do postulado de Koch, mas também avaliar o grau de resistência dum certo número de variedades comerciais de batata e determinar alguns hospedeiros das nossas culturas.

Como material de inoculação usaram-se culturas de quarenta e oito horas em gelose de batata. As plantas foram sempre cultivadas, em vaso, na estufa. Todos os isolamentos inoculados experimentalmente reproduziram os sintomas observados naturalmente.

Os reisolamentos foram comparados com as culturas primeiramente isoladas, tendo sido comprovada a sua identidade. Foram feitas bastantes reínoculações, tendo havido sempre reprodução da doença.

A infecção natural foi realizada em vasos contendo terra fortemente infectada. Para isso, misturava-se a essa terra detritos de plantas doentes ou vasavam-se-lhe culturas puras, de quarenta e oito horas, em caldo de batata. Passado uns quinze a dezasseis dias, as plantas a ensaiar eram plantadas ou transplantadas para aqueles vasos. Na transplantação fez-se sempre uma ligeira poda radicular, para asssim expor as plantas a maior facilidade de contaminação.

Todos os ensaios referentes a este capítulo foram feitos em dois períodos, o primeiro nos meses de Julho a Setembro de 1944 e o segundo de Abril a Setembro de 1945.

Solanum tuberosum

a) *Inoculação no tubérculo*

Para esta inoculação fazia-se um golpe equatorial no tubérculo, de modo a atingir o anel vascular, onde se depositava o material inoculante. O tubérculo, bem brolhado, era imediatamente plantado. Os primeiros sintomas notaram-se geralmente quinze,

dezasseis ou dezassete dias após a inoculação. Manifestavam-se pelo começo de emurchecimento das folhas, cujos feixes vasculares estavam em relação com o sector do anel vascular onde se tinha depositado o inóculo.

O emurchecimento ia-se generalizando, e ao vigésimo quinto, trigésimo dia a planta apresentava todas as folhas murchas.

Na Est. IV, a fig. 11 e a fig. 12 mostram a fase inicial e final do emurchecimento duma batateira.

O período de inoculação da doença aumentava, por vezes, uns três a sete dias nalgumas inoculações. Na generalidade, porém, este tempo foi o anteriormente citado. As condições ambientais, pelos factores temperatura e humidade, determinaram esta variação.

Procurou-se avaliar a reacção de quarenta e cinco variedades comerciais de batata. Para isso usou-se o método de inoculação atrás apontado. De cada variedade inocularam-se seis tubérculos. O ensaio foi repetido três vezes, tendo-se usado as culturas A_1, CV_2 e L_3 respectivamente no primeiro, segundo e terceiro ensaios. A quantidade de inóculo foi de duas ansas em cada tubérculo.

As variedades ensaiadas foram:

Ackersegen	*Edda*	*Magestic*
Alberta	*Edelgard*	*Ostbote*
Ally	*Eigenheimer*	*Parnassia*
Altgold	*Erdgold*	*Pepo*
Alma	*Flava*	*Ragis 10*
Arran Cairn	*Fruhmmalle*	*Royal Kidney*
Arran Banner	*Gladstone*	*Sabina*
Arran Consul	*Helena*	*Sieglinde*
Barbara	*Hetman*	*Turina*
Bevelander	*Hindenburg*	*Up-to-Date*
Bintje	*Jubel de Richter*	*Valenciana*
Champion	*Kaiserkrone*	*Vermelha de Mira*
Chardonne	*Kerr's Pink*	*Wekaragis*
Corona Ragis	*Kmiec*	*Weltwunder*
Early rose	*Konsuragis*	*Wholtman*

Nenhuma destas variedades mostrou nítida superioridade sobre as outras. Os tempos de incubação variaram entre quinze a vinte e quatro dias, não só com a variedade mas também com o ensaio.

Sòmente a *Flava* se comportou nos três ensaios com um tempo de incubação mais ou menos constante — 22, 23 dias. O tempo de incubação da *Valenciana*, variedade de alto interesse no nosso País, oscilou entre quinze e dezassete dias. Em quase todas as outras variedades verificou-se uma oscilação, dentro dos limites acima referidos, não só de ensaio para ensaio, como de planta para planta. Parece-nos pois que, nas condições do ensaio, as variedades estudadas apresentam sensìvelmente o mesmo grau de susceptibilidade.

Na literatura também não aparece nenhuma variedade com nítida resistência. Algumas variedades, no entanto, têm sido apresentadas como possuindo maior valor que outras, no referente ao *Bact. solanacearum*. Assim, WELLENSIEK (1931), estudou trinta e duas variedades importadas da Holanda, e encontrou certo grau de resistência na Bortergele e Dauer Rages, por contrairem a infecção num estado mais adiantado de desenvolvimento do que as outras. DAVIDSON (1935) diz que a Red Bliss Triumph mostrou alguma resistência. EDDINS (1936 b) aponta a Green Mountain como tendo a maior resistência, seguida por Katahdin, Bliss Triumph, Seedling 41914, Yrish Cobler, Spaulding Rose e Chipewa. VAN DER GOOT (1937) apresenta a Schwarz 21 como tendo grande resistência. MÜLLER (1937) ensaiou trezentas variedades e encontrou um certo grau de resistência em Green Mountain, Epicure, Arran Conrade, Koninkjes, Kentang, Djawa, Kentang Djawa, Botergele. Diz também que os híbridos *S. tuberosum* × *S. andigenum* e *S. tuberosum* × *S. antipovicsii* apresentam bastante resistência. LE CLERG (1942) diz que a variedade Katahdin apresenta certa resistência.

Nos nossos ensaios não nos foi possível trabalhar com qualquer destas variedades, por não existirem à data em Portugal, e ser difícil a sua obtenção.

b) *Inoculação na parte aérea*

Esta inoculação foi feita por picada, nos caules e nos pecíolos das folhas. Conforme o estado de desenvolvimento da planta, assim era maior ou menor o período de incubação da doença.

Inoculações feitas após o nascimento, e nos estados seguintes do crescimento, provocaram, passados quinze a vinte cinco dias, o aparecimento de murchidões, que se generalizaram a toda a planta até à morte. As inoculações feitas mais ou menos no começo e

durante a floração, raramente se generalizaram, e causaram sòmente a murchidão dos ramos ou das folhas interessadas. A planta continuava a vegetar, mas os tubérculos que dela provinham ou apresentavam nítidos sintomas ou, quando plantados, reproduziam a doença na planta a que davam origem. As inoculações feitas em estados posteriores de desenvolvimento raramente provocavam qualquer murchidão, resultando quase sempre em inoculações negativas.

c) *Infecção de terras*

Tanto nas terras infectadas com material doente como nas que foram inoculadas com culturas puras, plantaram-se tubérculos bem brolhados, umas vezes inteiros outras vezes cortados ao meio. O aparecimento de sintomas nas plantas provenientes de tubérculos cortados era mais rápido — vinte a vinte e cinco dias após a plantação, do que nos provenientes de tubérculos inteiros. Em qualquer caso, porém, sobrevinha sempre a morte da planta, dado o forte grau de infecção das terras.

Também se procedeu à transplantação de batateiras com dez, doze e catorze dias, para vasos com terras infectadas, e os primeiros sintomas da doença eram visíveis passado dez a quinze dias.

Lycopersicum esculentum

a) *Inoculação por picada*

As inoculações fizeram-se no caule e nos pecíolos das folhas de plantas muito novas. Os primeiros sintomas de emurchecimento apareciam, normalmente, ao décimo, ou décimo primeiro dia. Após catorze ou quinze dias as plantas apresentavam-se todas murchas.

Vê-se, pois, que o tempo de incubação nesta espécie é menor que na anterior.

Na Est. IV, fig. 13 mostra o aspecto dum tomateiro após quinze dias de ter sido inoculado.

Antes, porém, de aparecer qualquer emurchecimento, notava-se a epinastia das folhas, muito mais evidente do que na batateira e ainda outro sintoma que era a formação de raízes adventícias ao longo do caule.

Se bem que esta formação seja normal no tomateiro, o aparecimento de cones radicíferos nas plantas doentes antecedia muito

o aparecimento nas plantas sãs. Fizeram-se inoculações massiças em plantas da mesma idade e desenvolvimento, com igual número de testemunhas, e aquele aspecto mostrou-se duma constância flagrante. Na Est. III, a fig. 10 apresenta dois caules de tomateiros jóvens, após sete dias de inoculação, onde se veem os cones radicíferos na planta inoculada com uma das nossas culturas e nenhuma na planta picada com uma agulha esterilizada. Na Est. II, a fig. 7 mostra o corte transversal dum destes cones. A fig. 9 da Est. III apresenta as raízes já formadas depois de se ter feito a imersão dum caule de tomateiro, inoculado com uma cultura, no líquido de Knopp.

O aparecimento destes dois sintomas, apontado também por grande número de investigadores, ainda não foi completa e totalmente esclarecido. São os trabalhos de GRIEVE (1936 a, 1936 b, 1937, 1939, 1941 e 1944) que maior informação nos fornecem sobre este aspecto.

Diz GRIEVE que a epinastia provocada pelo *Bact. solanacearum* no tomateiro e batateira é uma reacção de crescimento irreversível e que, enquanto na batateira a gravidade não neutraliza ou coopera nessa epinastia, no tomateiro aquela tem certa influência, pois que as plantas invertidas não mostraram epinastia. Diz também que este fenómeno não é devido ao entupimento mecânico dos vasos ou à produção de toxinas.

Não está, no entanto, ainda provado que ela seja devido a uma heteroauxina, pois que, embora esta tenha sido isolada dos meios de cultura em quantidades suficientes para induzir epinastia, não foi ainda isolada dos vasos invadidos pela bactéria.

Na formação de raízes adventícias, diz o mesmo autor, em 1939, parece desempenhar papel importante o entupimento mecânico dos vasos, mas a semelhança entre a formação de raízes provocado pelo ácido β-indol-acético e a formação nas plantas doentes pode indicar que não é estranha a esta formação de raízes uma substância de crescimento. Nos trabalhos posteriores também não se esclarece a questão, mas diz ser insustentável a hipótese de formação do ácido indol-3-acético provocada pelo organismo bacteriano na planta e também não haver provas concludentes para se poder atribuir o fenómeno a uma maior produção de substâncias de crescimento, provocada por um estímulo da presença física da bactéria nos feixes vasculares. Há, no entanto, fortes indicações

para pensar que se dá nas plantas doentes o mesmo mecanismo que se opera pelas substâncias de crescimento.

Destes trabalhos e das nossas observações pode-se, em última análise, concluir, por enquanto, que:

A bactéria provoca nas plantas de batateira e de tomateiro um fenómeno de distenção celular, a epinastia, que deve ser provocada ou por uma hormona da distenção celular formada pelas células do hospedeiro em virtude do estímulo provocado pela bactéria ou então pela heteroauxina formada à custa do substratum da bactéria. Esta, ainda que apareça em certa quantidade nos meios de cultura, não tem sido possível determiná-la nos tecidos das plantas atacadas.

A epinastia na batateira e tomateiro é distinta, pois que naquela não influi a força da gravidade. A interpretação deste facto é difícil à luz da fisiologia e parece-nos que sòmente qualquer conformação morfológica especial o poderá explicar.

No tomateiro, a bactéria provoca além disso uma prematura formação de cones radicíferos, fenómeno de proliferação celular, e que fora de dúvida é devido à rizocalina. O maior aparecimento desta ou será devido a uma acumulação provocada pelo entupimento mecânico dos vasos pela bactéria ou à influência da sua aparição provocada pela heteroauxina, se acaso esta se forma, à custa da bactéria, nos tecidos do hospedeiro. Esta segunda hipótese, como se diz atrás, é considerada por GRIEVE como insustentável.

b) *Infecção das terras*

Na transferência das plantas para vasos com terras infectadas procurou-se respeitar sempre a maturidade de transplantação.

Os primeiros sintomas de emurchecimento apareciam, normalmente, após dezassete, dezoito ou dezanove dias, acabando a planta por morrer.

Eram também antecedidos pela formação de raízes adventícias ao longo dos caules.

Nicotiana glutinosa

a) *Inoculação por picada*

Estas inoculações foram feitas nos pecíolos e nas nervuras centrais das folhas de plantas novas. As plantas postas durante

trinta e seis horas em câmara húmida apresentavam os primeiros sintomas de murchidão ao sétimo ou oitava dia, nas folhas que tinham sido inoculadas. O emurchecimento progredia, e ao décimo sexto — décimo sétimo dia tinha-se generalizado a toda a planta.

A fig. 14 da Est. IV mostra o aspecto dum começo de emurchecimento (décimo dia após a inoculação) em comparação com uma planta testemunha que sofreu o mesmo número de picadas com uma agulha esterilizada.

As plantas inoculadas, não colocadas em câmara húmida, apresentaram um tempo de incubação maior ou menor, conforme as condições ambientais de temperatura e humidade.

Aquele tempo, no entanto, nunca foi superior a onze dias.

b) *Infecção de terras*

As plantas transplantadas para vasos com terra infectada apresentavam sinais de emurchecimento após doze-catorze dias. A transplantação das plantas fazia-se sempre quando estas apresentavam três folhas.

Phaseolus vulgaris, P. multiflorus, Helianthus annus, Solanum nigrum

a) *Inoculação por picada*

Estas inoculações foram feitas na base dos caules e nas nervuras centrais das folhas de plantas novas. As plantas eram postas em câmara húmida durante quarenta e oito horas.

Experimentaram-se cinco variedades comerciais de feijão ordinário, uma de feijão encarnado, três variedades de *Solanum nigrum-macrocarpum*, *miniatum* e *luteum* e uma de *Helianthus annus*.

Nunca foi observado qualquer emurchecimento. As plantas inoculadas apresentaram, no entanto, um nítido nanismo em relação às testemunhas, que se ia acentuando à medida da sua evolução. Os reisolamentos feitos de algumas delas, mostraram-nos a permanência e multiplicação da bactéria nos seus tecidos.

b) *Infecção de terras*

As plantas transplantadas para vasos com terras infectadas mostraram ùnicamente, como no caso anterior, sintomas de nanismo.

Nenhuma outra planta ensaiada mostrou quaisquer sintomas, tanto na inoculação da parte aérea, por picada, como na trans-

plantação para vasos com terra infectada. Algumas são dadas por SMITH (1939) como hospedeiros naturais do *Bact. solanacearum*, outras como contraindo a infecção por inoculação experimental e outras como imunes. São do primeiro tipo as assinaladas com um N, do segundo com um A e do terceiro com um I. As plantas assinaladas com um E são indicadas como hospedeiros por ELLIOT (1930). As que não apresentam sinalização não têm referência na literatura citada:

Ageratus conyzoides — E
Chrysanthemum coronarium — E
Cucumis Melo — I
Cucurbita melopepo
Datura stramonium — N
Erigeron canadensis — E
Nicotiana glauca — E
Nicotiana Tabacum — N
Ornithopus sativus
Pisum sativum — I
Plantago lagopus, var. *lusitanica*
Plantago Coronopus
Plantago lanceolata
Plantago major
Ricinus communis — N
Solanum capsicastrum
Solanum Dulcamara
Solanum pseudo-capsicum
Trifolium incarnatum — I
Trifolium Alexandrinum
Vigna sinensis — A
Zea Mays — I

O facto de as nossas culturas não atacarem certas plantas, consideradas como hospedeiros naturais do *Bact. solanacearum*, E. F. Smith, especialmente o tabaco, é um dos aspectos mais flagrantemente diferenciais que as distinguem da estirpe estudada por SIMTH. Em inúmeras inoculações que se fizeram nunca se conseguiram resultados positivos com *N. Tabacum*, o mesmo sucedendo com *D. stramonium*. MAIA e OLIVEIRA (1943) também não conseguiram inoculações positivas nestas duas espécies.

Na literatura apontam-se alguns casos em que não se conseguiu infectar o tabaco. Assim NOLLA (1931) diz ter encontrado em Porto Rico uma estirpe que não ataca o tabaco. WAGGER (1931) diz que na África do Sul a estirpe encontrada raramente ataca o tabaco. LABROUSSE (1933), de uma cultura isolada em Marrocos não conseguiu também inoculações positivas no tabaco. GRIEVE (1936 a) cita também uma estirpe para a qual o tabaco é imune. ALENCAR e DRUMOND (1944) não conseguiram inoculações positivas em tabaco com as culturas com que trabalharam.

PERMANÊNCIA DA BACTÉRIA NAS TERRAS

A permanência no solo do *Bact. solanacearum* de uns anos para os outros é opinião geral de todos os autores, entre eles: WAGGER (1931), NOLLA (1931), DAVIDSON (1935), SILVEIRA e AZEVEDO (1935), HINO (1935), EDDINS (1936), MARTIN (1939), ANON. (1941), LE CLERG (1942), ALENCAR e DRUMOND (1944), SMITH (1944), etc.

Por dificuldades de tempo foi-nos impossível determinar o limite máximo dessa permanência.

Fez-se, no entanto, um pequeno ensaio em vasos, por não ser possível trabalhar em pleno campo, dado o perigo que poderia constituir para a região, Sacavém, onde ainda não foi encontrado « pús ».

Em Julho de 1944 infectaram-se as terras de trinta vasos, pelo processo descrito no cap. « Inoculações experimentais », e guardaram-se durante doze meses, regando-os periòdicamente.

Em Julho de 1945 plantaram-se metades de batata, completamente sãs, nestas terras. Em fins de Agosto as plantas de cinco dos vasos mostraram os primeiros sintomas de emurchecimento, continuando, no entanto, a vegetar. A colheita foi feita em Outubro, não tendo morrido nenhuma planta. É de atender que nos últimos dois meses as condições ambientais já não se mostraram propícias ao desenvolvimento da doença.

O exame dos tubérculos colhidos mostrou-nos, porém, a sobrevivência da bactéria nas terras.

Só os tubérculos provenientes de dois vasos não mostraram quaisquer sintomas da doença, mesmo depois de novamente plantados.

MEIOS DE LUTA

Não nos foi possível, no tempo de realização deste trabalho, determinar medidas seguras capazes de debelar a doença. Vamos, contudo, procurar fazer uma síntese dos processos de combate que nos parecem de maior interesse.

a) Uso de « semente » isenta de doença.

Sabido que um dos principais meios de disseminação do mal é o uso de «sementes» infectadas, torna-se indispensável utilizar na « sementeira » tubérculos completamente sãos.

Nem sempre, no entanto, se torna fácil a obdiência a este princípio. Mesmo com o critério de sistemàticamente rejeitar qualquer tubérculo que apresente sintomas, não teríamos garantia absoluta de sanidade, pois que muitas vezes aqueles não são visíveis e só depois se vão revelar na nova planta.

Só a ausência absoluta da bactéria nas plantações que irão dar origem aos tubérculos para «semente», e também a sua ausência nas terras onde se fizeram essas plantações, poderá assegurar a perfeita sanidade da « semente » em relação a esta doença.

Ora, como se sabe, e em boa técnica, o lavrador adquire a sua semente a estranhos. Torna-se porisso necessário protegê-lo eficazmente por meio duma legislação adequada, que, duma vez para sempre, afaste a possibilidade de qualquer sofisma na «batata-semente».

b) Plantação em terrenos não infectados.

Viu-se neste trabalho, e apontam-no todos os investigadores, que as plantas contraem a doença quando semeadas, plantadas ou transplantadas para terrenos infectados.

Torna-se pois necessário que, para o êxito económico da cultura, se respeite este princípio.

Sucede, porém, muitas vezes, que os terrenos a aproveitar se encontram infectados. Deve neste caso recorrer-se à sua desinfecção, ou à rotação cultural com plantas não susceptíveis.

1. A desinfecção do solo tem sido preconizada recorrendo a um abaixamento do seu pH. O princípio desta desinfecção é simples: provocar uma acidez no terreno que seja incompatível com a vida da bactéria, passado o que se baixa essa acidez, para facilitar a cultura das plantas.

Vários investigadores apresentam ensaios mais ou menos satisfatórios, referentes a este aspecto. TISDALE (1934, 1935), diz que em dois campos de batata, aplicações de enxôfre, seguidas na estação seguinte de aplicações de cal muito fina, eliminaram pràcticamente o «bacterial wilt», e aumentaram a produção de tubérculos. Diz que o aumento de acidez no solo, pelo enxôfre, além de 4.57, mata provàvelmente as bactérias, pelo que a doença não reapareceu quando o pH foi elevado para 5.29 e 5.49 pela calagem.

EDDINS (1936 a), diz que o *Bact. solanacearum* foi debelado em West Tocoi, na Flórida, pela aplicação ao solo, em Junho de 1934, de enxôfre, seguido da aplicação de cal, em Novembro. O organismo patogénico foi morto ou tornado não virulento pela aplicação de oitocentas libras de enxôfre, por acre, que reduziram o pH do solo de 5.0 para ligeiramente abaixo de 4.0. A reacção do solo voltou à inicial, aproximadamente, pela aplicação de três mil libras de cal por acre. Este tratamento, além de debelar a doença, contribuíu para um aumento de produção da cultura.

EDDINS (1936 b) diz que a doença pode ser evitada com aplicações de enxôfre, ao solo, da ordem das quatrocentas a mil e duzentas libras por acre. As produções, em vista deste tratamento, serão menores, mas esta diminuição desaparecerá quer por um ajustamento próprio do solo a uma reacção mais alcalina, quer por aplicações de cal nos três anos seguintes ao tratamento com enxôfre. Este abaixamento de acidez não é acompanhado dum recrudescimento da doença.

VAN DER POEL (1934) fez também experiências neste sentido, na Sumatra, com bons resultados.

EDDINS (1939) confirma os resultados satisfatórios anteriormente referidos (1936 a). Diz que cada cem libras de enxôfre, por acre, mudam a reacção cerca de pH 0.15 em aplicações de quatrocentas libras, e de pH 0.2 em aplicações de quinhentas, seiscentas ou oitocentas libras, por acre. Diz também que em solos cuja acidez foi levada a pH 3.8, 3.9, se obtêm óptimas produções com a aplicação de três mil libras de cal por acre.

EDDINS (1940) confirma que a aplicação de enxôfre deve ser feita a seguir à colheita (Maio, Junho), de forma a baixar o pH a 4.0 ou inferior, o que necessita de aplicações de enxôfre que vão de trezentas libras por acre, em solos com um pH de 4.4 a mil e trezentas libras nos solos com um pH de 6.4. Em Outubro

ou Novembro seguintes, a reacção do solo deve voltar a 5.2, se se quizer plantar batatas, pela aplicação de cal em quantidades que vão de duas mil a cinco mil libras por acre. Durante o período entre os dois tratamentos aconselha a cultura duma leguminosa.

LE CLERG (1941) diz que na Flórida usou-se, com bons resultados, aplicações, em Junho, de oitocentas libras de enxôfre, seguidas de três mil libras de cal, por acre, em Novembro.

DIPPENAAR (1943) aponta resultados razoáveis com o abaixamento do pH do solo para 4.0 ou para valores inferiores, pela aplicação de enxôfre.

Para facilitar a aplicação deste processo de combate, fez-se neste trabalho um ensaio da resistência à acidez das culturas estudadas.

2. A rotação cultural com plantas não susceptíveis considera-se um processo para debelar a doença nos terrenos infectados.

Não existe, contudo, aquela soma de experimentação que permita aconselhar esta forma de trabalho como absolutamente eficaz.

A maioria dos autores indicam rotações de 4 em 4 ou de 5 em 5 anos.

SMITH (1941), num trabalho que realizou sobre este assunto, para a cultura do tabaco, apresenta, entre outras, as seguintes conclusões: a) Rotações com batata dôce, com o terreno preparado e deixado à vegetação natural ou com o terreno preparado e limpo foram comparativamente ineficientes; b) o milho não é significativamente mais eficiente que a soja, e ambos são mais eficientes do que o terreno preparado e conservado limpo. Estes três são mais eficientes do que a cultura contínua de tabaco; c) cinco anos de rotação foram mais eficientes do que dois ou três anos.

No capítulo «Inoculações experimentais» do presente trabalho, encontram-se elementos que nos permitem estabelecer estas rotações.

c) Variedades imunes ou resistentes.

Constitui, como se sabe, a principal arma do fitopatolista.

No capítulo «Inoculações experimentais» e em MORAES (1946) encontram-se as principais bases de que o melhorador da batateira pode lançar mão, para o combate a esta doença.

Fora destes princípios fundamentais, ou na impossibilidade de os aplicar, vários outros cuidados se preconizam para diminuir a intensidade da doença:

1. Desinfecção de facas — sempre que se cortem os tubérculos, convém desinfectar a navalha, de cada vez que seja cortado um tubérculo atacado. Para isso poder-se-á usar uma solução de sublimado a um por mil, soluto de iodo a 1 %, duma solução de formalina do comércio a 5 %, água fervente ou passagem à chama.

2. Arranque e queima imediata de todas as plantas ou detritos de plantas que manisfestem os sintomas da doença.

3. Combater os insectos que possam ser transmissores da bactéria. MEIER e LINK (1923) apontam o escaravelho americano como sendo um destes insectos. NOLLA (1932) aponta a *Diabrotica Graminea* como disseminador da doença.

4. Evitar que as águas da rega ou da chuva que passam por um terreno infectado vão passar sobre outro ainda limpo.

5. Evitar que as ferramentas que serviram um terreno infectado vão servir num terreno limpo, sem prévia desinfecção.

6. Uso de certos adubos, SMITH e CLAYTON (1943), VAN DER POEL (1938).

7. Evitar as regas exageradas e manter o terreno em boas condições de drenagem.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1. Estudou-se o agente causador do «pús» da batateira, tendo feito isolamentos de material de dezoito diferentes origens, englobando as principais regiões de batata do País.

Depois de comprovada a patogenecidade, nunca foi determinada qualquer bactéria não móvel, Gram-positiva, que reproduzisse a doença. Ficou assim afastada a idéia de, no material recebido, a doença ser causada pelo *Corynebacterium sepedonicum.*

2. Dos isolamentos feitos selecionaram-se oito, sobre que recaíu toda a experimentação.

3. As inoculações experimentais e a plantação ou transplantação para terras infectadas, provocaram emurchecimento nas espécies *Solanum tuberosum*, *Lycopersicum esculentum* e *Nicotiana glutinosa.*

Nas espécies *Phaseolus vulgaris*, *Ph. multiflorus*, *Solanum nigrum* e *Helianthus annus* sòmente se observou um acentuado nanismo, tendo a bactéria sido reisolada de todas as espécies atrás citadas.

4. Nunca, entre nós, foi observada a coloração castanha dos feixes vasculares, a não ser nos tubérculos.

5. Na batateira e no tomateiro, antes de qualquer emurchecimento, notou-se a epinastia das folhas, mais evidente na segunda espécie que na primeira. Como fenómeno de distenção celular, ou será devido a uma hormona de distenção ou à heteroauxina.

6. No tomateiro, além da epinastia, houve sempre uma formação antecipada de cones radicíferos, ao longo do caule.

Como fenómeno de proliferação celular será devido à rizocalina cujo maior aparecimento será motivado ou por um entupimento mecânico dos vasos ou pela produção da heteroauxina.

O estudo anatómico mostrou que as raízes incipientes estavam em ligação com os vasos atacados pela bactéria.

7. Foram experimentadas quarenta e cinco variedades comerciais de batata, nenhuma delas mostrando menor susceptibilidade ao organismo que as outras.

8. Não se obtiveram infecções naturais ou inoculações experimentais positivas nas seguintes espécies: *Ageratus conyzoides*, *Chrisanthemum coronarium*, *Cucumis Melo*, *Curcubita melopepo*, *Datura stramonium*, *Erigeron canadensis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana Tabacum*, *Ornithopus sativus*, *Pisum sativum*, *Plantago lagopus*, var. *lusitanica*, *Plantago coronopus*, *Plantago major*, *Ricinus communis*, *Solanum capsicastrum*, *Solanum Dulcamara*, *Solanum pseudo-capsicum*, *Vigna sinensis*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium Alexandrinum*, *Zea Mays*.

9. O estudo anatómico das plantas doentes mostrou que a bactéria se encontra principalmente nos vasos do xilema. Quando o ataque é intenso, o organismo passa dos vasos, por dissolução ou rompimento das paredes destes, para os espaços intercelulares, formando cavidades bacterianas.

10. As oito culturas estudadas mostraram idênticas características morfológicas, culturas e fisiológicas.

11. As características morfológicas mostraram que o organismo tinha dimensões compreendidas entre $1{,}2\text{-}1{,}5 \times 0{,}5\text{-}0{,}6\ \mu$, era móvel por meio dum único flagelo polar, não capsulado, não esporulado, Gram-negativo e não ácido-resistente.

12. As características culturais mostraram que o organismo não crescia nos meios de gelose de malte, gelose de cenoura, gelose de levedura e gelose de batata glucosada a 2 %, sendo o óptimo

de crescimento observado em gelose de batata e em gelose de infusão de carne fresca.

Nos cilindros de batata formava-se um pigmento castanho. Não havia crescimento nas soluções de Cohn e de Fermi, havendo na solução de Ushinsky.

O organismo apresentou crescimento no meio sintético de asparagina; não foi observado crescimento num meio contendo dicromato de potássio.

13. As características fisiológicas mostraram que o organismo era estritamente aeróbio; redutor dos nitratos sem produção de gás, não acusando formação de amónia e de indol; produzindo ácido sulfídrico; tendo uma parcial acção diastásica; peptonisando o leite simples, alcalinizando o leite tornesolado e o leite com púrpura de bromo-cresol.

Sobre treze compostos de carbono ensaiados não houve produção de gás. Neste ensaio, usando como meio água de peptona e como indicador o indicador de Andrade, não houve produção de ácido. Usando, porém, um meio sintético (Manual of Methods II — 36 : 14) e como indicador a púrpura de bromo-cresol, houve produção de ácido nos seguintes compostos de carbono: galactose, manose, dextrose, lactose, sacarose, maltose, glicerol e adonitol. Não houve produção de ácido em xilose, inulina, manitol, salicina e aesculina.

Esta diferença de resultados pode explicar-se em virtude dos organismos produzirem fracas quantidades de ácido, não reveláveis pelo indicador de Andrade, menos sensível que a púrpura de bromo-cresol, e porque num caso se usou um meio com uma substância de certo modo tamponisante — a peptona.

14. A resistência das culturas estudadas à secura mostrou ser muito pequena, podendo explicar, de certo modo, a menor intensidade da doença quando falta a água na cultura das plantas.

15. As temperaturas mínima, óptima e máxima de crescimento e a temperatura letal mostraram-se inferiores, nas culturas que se estudaram, às apontadas na literatura para o *Bact. solanacearum*, E. F. Smith.

16. A resistência das culturas à acidez do meio foi feita em caldo de batata, mostrando estar compreendida entre os limites de pH 4.01 e 4,35.

17. Fizeram-se ensaios de aglutinação que mostraram perfeita identidade das oito culturas estudadas.

18. As reacções serológicas mostraram um tipo especial de aglutinação, explicável pela relação óptima de antígeno-constante.

19. As nossas culturas mostraram-se inofensivas para os animais com que se trabalhou e não foram notadas aglutininas «naturais» no sangue das cobaias.

20. Dada a indentidade morfológica, cultural, fisiológica e serológica das oito culturas estudadas, julgamos poder concluir que se trata dum única estirpe.

21. Comparando as nossas culturas com o *Bact. solanacearum*, E. F. Smith, vê-se que diferem dele pelo não escurecimento dos feixes vasculares das plantas infectadas, exceptuando os dos tubérculos, pela não produção de amónia, por uma mais baixa gama de temperaturas, e pelo menor número de inoculações positivas obtidas, muito especialmente pelo facto de não atacarem *Nicotiana Tabacum* e *Datura stramonium*.

Por isto, as culturas estudadas parecem ser uma estirpe do *Bact. solanacearum*, E. F. Smith.

22. Apresenta-se uma síntese dos meios de luta que parecem revestir maior interesse contra esta doença.

SUMMARY

The incidence of a bacterial disease of potatoes has attained such an increment in Portugal since 1939, that pratically no potato region in this country can now be considered free of the infection. In some regions potato culture is no longer economic.

Symptoms of the disease are those of potato brown rot produced by *Bacterium solanacearum* except that no brown discoloration of stem tissues has ever been observed.

In the present work the identification of the causal organism is made from material collected over the principal potato regions of the country. The results of morphological, cultural, biochemical and serological studies showed no differences amongst the different isolates.

The chief differences found between the author's isolations and *Bact. solanacerum* E. F. Smith. were:

a) no brown discoloration of stem tissues;
b) ammonia not produced;
c) lower temperature range;
d) narrower host range, neither *Nicotiana Tabucum* nor *Datura stramonium* being attack by the Portuguese organism.

In view of the identity of the above mentioned characters, it seems safe to conclude that all the isolations made can be refered to a single strain of *Bact. solanacearum*, E. F. Smith.

This strain shows very little resistance to drought as well as to the acidity of the medium, this last being comprised between pH 4.01 and pH 4.35.

Serological reactions have presented a special type of agglutination, which can be explained by the constant antigen optimal ratio.

Experimental inoculation with pure cultures, or planting in soils infected with the organism, cause decay in *Solanum tuberosum*, *Lycopersicum esculentum* and *Nicotiana glutinosa*. A marked dwarfing of the inoculated plants was noticed in *Phaseolus vulgaris*, *Ph. multiflorus*, *Solanum nigrum* and *Helianthus annus*. Re-isolation of the organism was allways possible in the case of the susceptible species. In *Solanum tuberosum* and *Lycopersicum esculentum* epinasty of the leaves was observed previous to decay and in the last named species the formation of adventitious roots as well. Forty five different comercial varieties of potato were tested and none showed the slightest sign of resistance to infection by the organism. Twenty two other different species of plants belonging to several genera and families were also tried but no infection resulted.

Some suggestions are made for control measures which seem more adequate to this disease.

BIBLIOGRAFIA

ALENCAR, J. e DRUMMOND, O. A.

1944 Notas sobre a murcha bacteriana da batatinha e do tomateiro — *Bacterium Solanacearum*, Smith. *Ceres* **5** (27): 178.

ANÓNIMO

Manual of methods for pure culture study of bacteria. Ed. Comitee on Bacteriological Technic of the Society of American Bacteriologists. Geneva. N. Y.

ANÓNIMO

1927 Trabajos de las Estaciones de Fitopatologia en 1927. *Bol. Pat. Veg. Y Ent. Agric.* 3:

BENSAÚDE, M.

1943 A bacteriose anular da batateira. *Notícias Agrícola*, 7-I-1943.

BERGEY, D. H.

1930 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 3 th ed, Ed. Baillière, Tindall & Cox, London.

BOURIQUET, G.

1934 Les maladies du Tabac à Madagascar. *Ann. des Crytog. exot.* **7**: 97.

BURKHOLDER, W. H.

1938 The occurence in the United States of the Tuber ring rot and wilt of the potato. *Amer. Pot. Jour.* **15**: 243.

1939 The Taxonomy and nomenclature of the phytopathogenic bacteria. *Phytopath.* **29**: 129-135.

CABRAL, R. V. DE G.

1944 *A study of the plant pathogen Xanthomonas begoniae (Takimoto) Dowson.* Dissertation submitted for the degree of Doctor of Phylosophy. University of Cambridge. (Dactilografado).

CLARA, F. M.

1934 A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogenes. *Cornell Agric. Exp. Sta. Mem.* **159**: 1-36. Cit. BURKHOLDER, 1939, e STARR e WEISS, 1943.

CLARK, W. M. and LUBS, H. A.

1917 A substitute for litmus for use in milk cultures. *J. Agric. Res.* **10**: 105-111.

COSTA CRUZ, J. DA

1929 *C. R. Soc. Biol.* **100**-932. Cit. TOPLEY, 1933.

CUNNINGHAM, A.

1924 *Practical Bacteriology.* Ed. Oliver And Boyd. London, Edinburg.

DAVIDSON, H. F.

1935 Bacterial wilt of solanaceous crops. *Trop. Agriculturist* **4**: 257. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **11**: 123, 1935).

DEAN, H. R.

1917 *Lancet.* **1**: 45. Cit. TOPLEY, 1933.

DEAN, H. R. and WEBB, R. A.

1926 *J. Path. Bact.* **29**: 473. Cit. TOPLEY, 1933.

DIPPENNAAR, B. J.

1943 Common scab, brown rot, and internal brown fleck of potatoes. *Fug. S. Afr.* **18**: 213. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **22**: 271, 1943).

DOWSON, W. J.

1939 On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogenes. *Zentralbe. Bakt.* etc. Abt. II **100** 177-93.

DUNCAN, J. T.

1932 *Brit. J. Exp. Path.* **13**: 489. Cit. TOPLEY, 1933.

EDDINS, A. H.

1936 a Bacterial wilt of potatoes, tomatoes and egg plant controlled with sulphur and limestone (Abstr. in *Phytopath* **26**: 91).

1936 b Brown rot of Yrish potatoes and its control. *Bull. Fla. Agric. Exp. Sta.* **299**: 44 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **16**: 271, 1936).

1939 a Adjusting pH reactions of soils with sulphur and limestone to control brown rot of potatoes. *Amer. Pot. Jour.* **16** (1): 6.

1939 b Some caracteristics of bacterial ring rot of potatoes. *Amer. Pot. Jour.* **16** (12): 309.

1940 Brown rot of Solanaceous plants. Soil treatment for control of brown rot potatoes (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **21**: 216, 1942).

GERRETSEN, F. C., GRIJINS, A., SACH, J. und SOHNGEN, N. L.

1923 Das Vorkommen eines Bakteriophagen in der Wurzelknollchen der Leguminosen. *Zentralbl. Bakterial.* Abt. 2, **60**: 311. Cit. KATZNELSON, 1937.

GRIEVE, B. J.

1936 a On *Bact. solanacearum* as the causal agent of the brown rot disease of potatoes in Victoria. *Proc. Roy. Soc. Vict.* **48** (2): 49. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **16** (3): 201).

1936 b Effect of inoculation of plant stems with *Bact. solanacearum. Nature* **137**, 3465: 536.

1936 c A staining of maceration method of tracing the path of the vascular bundles in herbaceous plants, and its aplication in observations on the distribution of. *Bact. solanacearum* in relation to epinastic curvatures in petioles of tomato and potato. *Proc. Roy. Soc. Vict.* N. S. **49**: 72. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **16**: 285).

1937 Studies in stimulation phenomena in plants due to *Bact. solanacearum. Proc. Roy. Soc.* Ser. B, **124**: 42. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 302).

1939 Epinastic response induced in plants by *Bact. solanacearum. Ann. Bot. Lond.* N. S., **3**: 587.

1941 Studies in physiology of host-parasite relations. *Proc. roy. Soc. Vict.*, N. S., **53**, (2): 323. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **21**: 91).

1944 Mechanism of abnormal and pathological growth: a review. *Proc. Roy. Soc. Vict.*, N. S., **55**: 109. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **23**: 8).

HEDAYETULLAH, S. e SAHA, J. C.

1941 Bacterial wilt disease of tomato. *Sci. e Cult.* **7**: 226. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **22**: 228).

HEUER, G.

1922 *Z. Hig.* **95**: 100. Cit. TOPLEY, 1933.

HINO, I.

1935 Antagonistic action of soil microbes with special reference to plant hygiene. *Trans. 3th int. congr. soil sci.* **1**: 173. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **15**: 395).

KATZNELSON, H.

1937 Bacteriophage in relation to plant diseases. *Bot. Rev.* **3** (10): 499.

KAWAMURA, E.

1940 Bacteriophage of *Bacterium Solanacerum. Bull. Sci. Fak. Kyusu Univ.* **9** (2): 148. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **21** (3): 171, 1942).

LABROUSSE, F.

1932 Essais sur la Technique bactériologique en pathologie végetale. Application à l'étude d'un certain nombre de maladies. *Extrait des Annales des Epiphyties.* **4** — Julho-Agosto.

1933 Notes de pathologie végetale. *Rev. Path. Vég. et Ent. Agric.*, **20**: 71 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **12**: 488, 1933).

LE CLERG, E. L.

1942 Potato production in Southern States. *Farmer's Bulletin*, **1904**: 25.

LEWIS, I. M.

1914 A bacterial disease of *Krodium* and *Pelargonium. Phytoph.* **4** (4): 221.

MAIA, R. M. e OLIVEIRA, MARIA L. D'

1943 *Uma doença bacteriana da batateira.* Tese apresentada ao I Congresso Nacional de Ciências Agrárias. Lisboa (Dactilografado).

MALLMANN, W. L.

1941 The selective bacteriostatic effect of show oxidising agents. *Jour. Bact.* **42**: 285.

MARRACH, J. and SMITH, J. C.

1930 *Proc. Roy. Soc.* B, **106**: 1. Cit. LOPLEY, 1933.

1931 *Brit. J. Exp. Path.* **12**: 30. Cit. TOPLEY, 1933.

1932 *Brit. J. Exp. Path.* **13**: 394. Cit. TOPLEY, 1933.

MARTHEN, E. A., LOWTHER, C. V. and LEACH, J. G.

1943 A differential medium for the isolation of *Phytomonas Sepedonica. Phytopath.* **33** (5): 406.

MARTIN, J. P.

1939 *Pathology. Rep. Hawaii Exp. Sta.* (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **18**: 477).

MATSUMOTO, T. e OKALIE, N.

1935 Bacteriophage in relation to *Bact. solanacearum.* I. Temperature relation specificity and serological reaction. *J. Soc. Trop. Agric.* **7**: 130. Cit. KATZNELSON, 1937 e Abstr. in *Rev. App. Myc.* **14**: 686, 1935.

1937 Bacteriophage in relation to *Bact. solanacearum.* II. Further studies on the phage and antiphagic Serum. *J. Soc. Trop. Agric.* **9**: 205 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 17, 1938).

X MEIER, F. C. and LINK G. K. K.

1923 Potato brown rot. *U. S. D. Agric. Circ.* **281**: 6. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **3**: 232, 1924).

MENOR, J. G.

1932 Enfermidades del platano, del guineo y del rubo. *Rev. Agric. S. Domingo*, **30**: 340. Cit. ALENCAR e DRUMOND, 1944.

MILLER, A. S.

1941 Reconocimiento de las enfermidades de las plantas cultivadas en Venezuela. *Bol. Soc. Venez. Cienc. Nat.* **7**: 99. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **21**: 324, 1942).

MILLES, A. A.

1933 *Brit. J. Exp. Path.* **14**: 43. Cit. TOPLEY, 1933.

MORAES, A. M.

1946 Acerca do melhoramento da batateira. (Revisão bibliográfica). *Revista Agronómica* **34** (3): 248-314.

MÜLLER, H. R. A.
1937 De aardappelsituatie op Java als gevolg van het optreden van eenige nierve Ziekten. *Landbouw*, **13**: 285. Cit. STEVENSON, 1940 e Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 60.

NOLLA, J. A. B.
1931 Studies on the bacterial wilt of the Solanaceous in Porto Rico. *Jour. Dept. Agric. Puerto Rico*, **15** (3): 287. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **11**: 39).

OLIVEIRA, MARIA L. D'
1943 Doenças bacterianas das plantas em Portugal. I — «Pé negro» e « Podridões húmidas ». *Agronomia Lusitana* **5** (3): 227.

OKALIE, N.
1937 Stndies on the variation of *Bact. Solanacearum* (preliminary report). *Ann. Phytopth. Soc. Japan* **7** (2): 95. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 303, 1938).

PARK, M.
1935 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **15**: 145, 1931).

PETRI, L.
1935 Rassegma dei casi fitopatolozici osservati nel 1943. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **15**: 679, 1936).

RAMON, G.
1922 *C. R. Soc. Biol.* **86**: 661. Cit. TOPLEY 1933.

ROGER, L.
1938 Sur deux maladies des Bananiers à la Guadeloupe. *Agron. colon.* **27**: 161. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 859, 1938).

SAVILE, D. B. C.
1937 Bacterial wilt and rot potatoes. *Sci. Agri.* **17** (8): 518. Cit. ALENCAR e DRUMOND, 1944.

SHÜTZE
1920 *Lanc.*, i. 93. Cit. TOPLEY e WILSON, 1931.
1921 *J. Hyg.*, 20. 330. Cit. TOPLEY e WILSON, 1931.

SILVEIRA e AZEVEDO, N. A.
1935 Sobre a doença da batatinha no município de Theresopolis. *Rodriguesia*, **1** (1): 9. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **14**: 790).

SMITH, E. F.
1914 *Bacteria in relation to plant diseases.* 3 vol. Ed. Carnegie Institution of Washington. Washington, D. C.
1920 *An introdution to bacterial diseases of plants.*

SMITH, T. E.
1939 Host range studies with *Bact. solanacearum. Jour. of Agric. Res.* **59** (6): 429.
1944 Control of bacterial wilt *(Bact. solanacearum)* of tobaco as influenced by crop rotation and chemical treatment of the soil. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **23**: 413).

SNIESZKO, S. F. and BONDE, R.
1943 Studies on the morphology, physiology, serology longevity, and pathogenecity of *Corinebacterium sepedonicum*. *Phytopath.* **33** (11): 1032.

STARR, H. P. and WEISS, J.

1943 Growth of phytopathogenic bacteria in a sinthetic asparagin medium. *Phytopath.* **33** (4): 314-18.

STEVENSON, F. J.

1940 Genetics, Cytogenics, and breeding in the potato: review of literature. *Amer. Pot. Jour.* **17** (11): 299.

STOUGHNON, R. H.

1930 Thionin and Orange G for the differential staining of bateria and fungi in plant tissues. *Ann. Appl. Biol.* **17**: 162.

TAKIMOTO

1940 Bacterial plant diseases in Japan. *Bull. Sci. Fak. Terk, Kyusú Univ,* **9** (1): 1 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **20**: 9, 1941).

TISDALE, W. B.

1934 Plant patology. (Ref. in *Rev. App. Myc.* **14**: 85, 1935).

1935 Plant pathology. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **14**: 563, 1935).

TOPLEY, W. W. C. and WILSON, C. S.

1931 *The principles of Bacteriology and Immunity.* 2 vol. Ed. Edward Arnold & C°. Londres.

TOPLEY, W. W. C.

1933 *An outline of imunity.* Ed Edward Arnold & C°. Londres.

VAN DER GOOT, P.

1937 Diseases and pests of cultivated crops in the Dutch East Indies in 1936, *Meded. Inst. Plziekt., Batávia.* (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **17**: 161).

VAN DER POEL, J.

1934 De inoloed van den basentaestand van der grond op Tabaksbibit en eenige andere tropische gewassen in Deli. *Bull. Deli Proefstant te Medan — Sumatra* **31**: 64. Cit. EDDINS, 1939.

WAGGER, V. A.

1931 Bacterial wilt of potatoes. *Farming in South Africa* **6** (62): 63. (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **11**: 123, 1932).

WEBER, G. F.

1923 Potato diseases and insects. *Florida Agric. Stat. Bull.* **169**: 103-63 (Abstr. in *Rev. App. Myc.* **3**: 475, 1924).

WELLENSIEK, S. J.

1931 De vatbaarheid voor slijziekte van 32 geimporteerde aardappelrassen *Konte Medo Inst. voor Plantenziekten,* **16**: 5. (Abstr. in *Rev. App. Myc* **10**: 492).

LEGENDA DAS GRAVURAS

Estampa I

Fig. 1 — Tubérculo de batata cortado a meio que, depois de comprimido entre os dedos, mostra cirros de bactérias exsudando do anel vascular.

Fig. 2 — Aspecto do corte de outro tubérculo com exsudação de massas bacterianas mais generalizadas.

Fig. 3 — Tubérculos com terra aderente aos «olhos», em virtude das massas bacterianas que por estes exsudam.

N. B. — A Fig. 1 é da autoria do Eng. Agron. ROSINDO MONIZ DA MAIA, e aqui publicada por sua amável cedência.

Estampa II

Figs. 4, 5, 6 — Cortes em caules de batateira, vendo-se vasos cheios de bactérias e cavidades bacterianas.

Fig. 7 — Corte transversal de um caule de tomateiro, mostrando uma raíz incipiente que se vê estar em ligação com os tecidos atacados pela bactéria.

Estampa III

Fig. 8 — Corte transversal de uma raíz de tomateiro vendo-se alguns vasos completamente cheios de bactérias.

Fig. 9 — Raízes adventícias num caule de tomateiro, depois de ter sido imerso numa solução de Knopp.

Fig. 10 — Dois caules de tomateiros jóvens sete dias após o tratamento, onde se vêem os cones radicíferos na planta inoculada com uma das nossas culturas e nenhum na planta picada com uma agulha esterilizada.

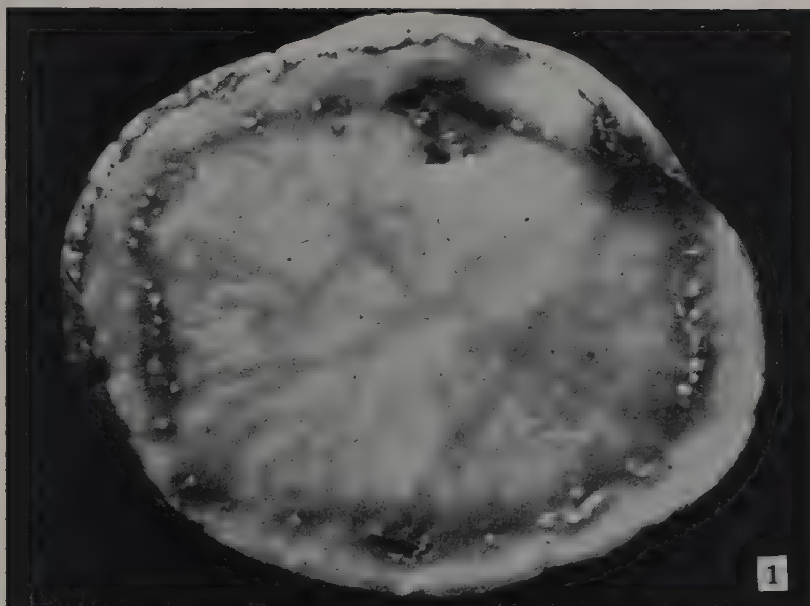
ESTAMPA IV

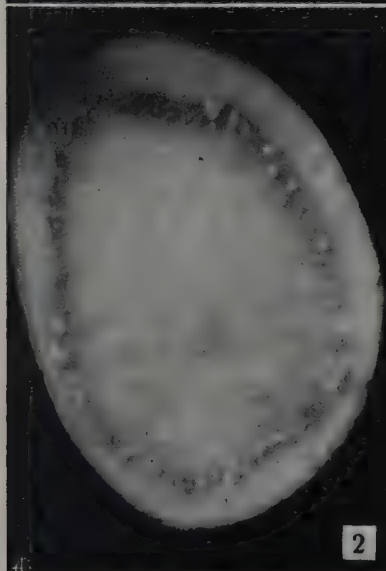
Fig. 11 — Fase inicial do emurchecimento duma batateira, dezassete dias após a inoculação.

Fig. 12 — Batateira completamente murcha, vinte e sete dias após a inoculação.

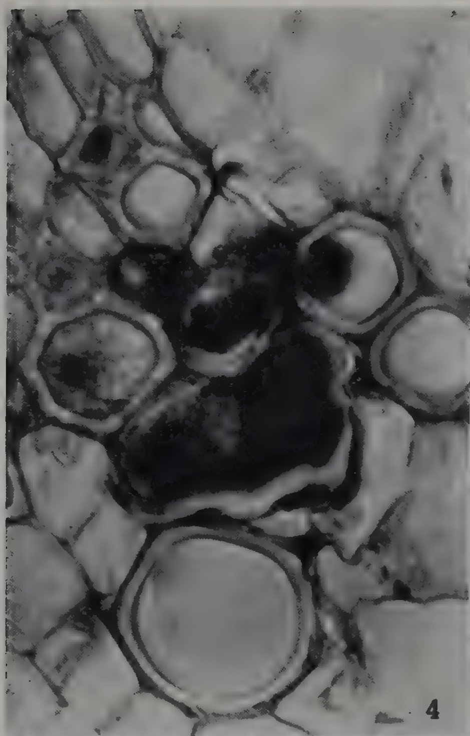
Fig. 13 — Aspecto dum tomateiro, quinze dias após ter sido inoculado, em comparação com uma planta testemunha.

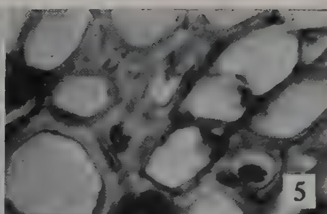
Fig. 14 — Primeiros sintomas de emurchecimento (décimo dia após a inoculação) numa planta de *Nicotiana glutinosa*, em comparação com uma planta testemunha.

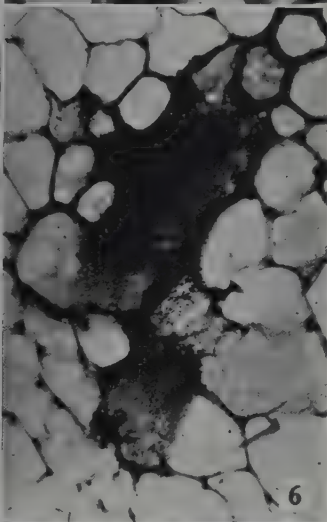

1

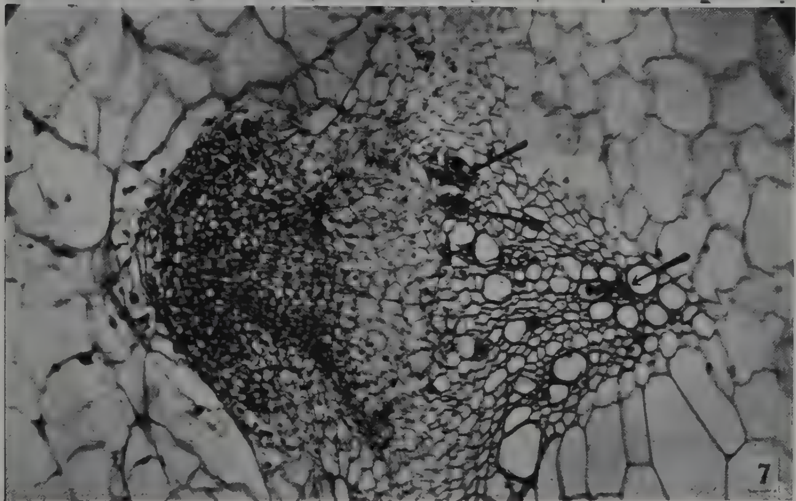

2

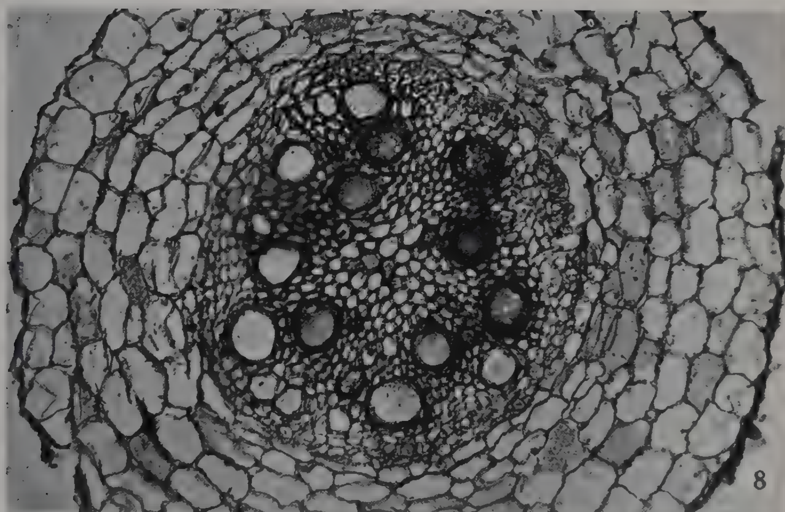

3


4


5


6


7


8


9

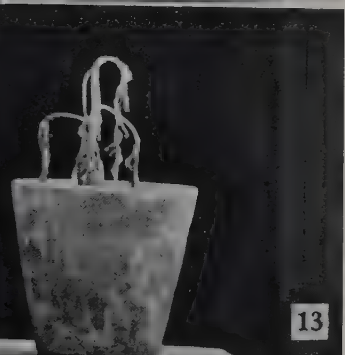

10



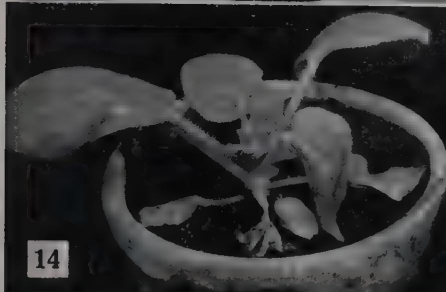
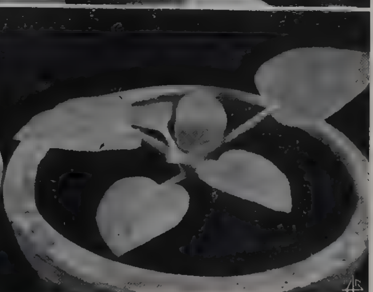
11



12

13

14

ÍNDICE DO VOLUME IX

SUMÁRIO